

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**Departamento de Psicobiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de marcadores biológicos en adicción a cocaína y  
comorbilidad psiquiátrica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Pedraz Fernández**

Directores

**Fernando Rodríguez de Fonseca  
Javier Pavón Morón**

**Madrid, 2016**



# **“Evaluación de Marcadores Biológico en Adicción a Cocaína y Comorbilidad Psiquiátrica”**

Trabajo presentado para optar a grado de DOCTOR

Por la Universidad Complutense de Madrid

María Pedraz Fernández

Septiembre 2015



# **“Evaluación de Marcadores Biológico en Adicción a Cocaína y Comorbilidad Psiquiátrica”**

María Pedraz Fernández

Tesis Doctoral

Directores de trabajo

Director

Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca

Co-director

Dr. Javier Pavón Morón

Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid.

Dr. Francisco Javier Pavón Morón, Investigador Miguel Servet I UGC Salud Mental- Neuropsicofarmacología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

CERTIFICAN:

Que la licenciada Doña. María Pedraz Fernández ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos clínico-experimentales por los cuales se ha realizado la presente Tesis Doctoral, titulada: "Evaluación de marcadores biológicos en adicción a cocaína y comorbilidad psiquiátrica".

Considerando que tanto el contenido científico como la presentación de la misma, reúnen las condiciones necesarias para su defensa y opción al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente certificado

Málaga, 17 Septiembre 2015.

Director de Tesis

Fdo. Fernando Rodríguez de Fonseca

Co-Director de Tesis

Fdo. Francisco Javier Pavón Morón

Yo, María Pedraz Fernández, declaro ser la autora de la presente Tesis Doctoral y trabajo de Investigación realizado en la UGC Salud Mental-Neuropsicofarmacología, Instituto de Investigación Biomédica IBIMA de Málaga, bajo la dirección del Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca y del Dr. Javier Pavón Morón.

Y para que así conste, firmo el presente certificado

Málaga, 17 Septiembre 2015.

Fdo. María Pedraz Fernández

# ÍNDICE

PREFACIO.....	0
<b>I.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. La adicción.....	1
1.1.1. Situación actual en Europa y España.....	2
1.1.2. Fases de la adicción.....	4
1.2. La adicción a cocaína.....	7
1.2.1. Neurobiología de la adicción a cocaína.....	9
1.2.2. Complicaciones asociadas al consumo de cocaína.....	10
1.2.3. Diferencias sexuales en adicción a cocaína.....	12
1.3. Comorbilidad psicopatológica.....	10
1.3.1. Definición comorbilidad psicopatológica.....	10
1.3.2. Comorbilidad psiquiátrica en la adicción a cocaína.....	14
1.3.3. Neurobiología de la comorbilidad psiquiátrica en adicción a cocaína.....	20
1.4. Estudios clínicos. Instrumentos.....	21
1.4.1. Los principales manuales diagnósticos de enfermedad mental.....	22
1.4.2. Instrumentos diagnósticos específicos población con problemas de adicción.....	22
1.4.3. Diagnóstico de Comorbilidad psiquiátrica.....	23
1.5. Marcadores biológicos.....	24
1.5.1. Mediadores periféricos del sistema inmunológico. Citoquinas y quemoquinas.....	25
1.5.2. Moduladores de estado homeostático interno. Derivados de ácidos grasos.....	28
1.5.3. Mediadores de plasticidad y crecimiento neuronal. Factores neurotróficos.....	32
<b>II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	
2.1. HIPOTESIS.....	36
2.1.1 Hipótesis. Estudio I.....	36
2.1.2. Hipótesis .Estudio II.....	37
2.1.3. Hipótesis. Estudio III.....	37
2.2. OBJETIVOS.....	38
2.2.1. Objetivos. Estudio I.....	38
2.2.2. Objetivos. Estudio II.....	39
2.2.3. Objetivos. Estudio III.....	39

### III. METODOLOGÍA

3.1 Diseño general.....	41
3.2. Población.....	41
3.2.1. Criterios de participación.....	42
3.2.2. Descripción población por estudios.....	43
3.3. Aspectos éticos.....	43
3.4. Evaluación clínica.....	44
3.4.1. Entrevista PRISM.....	44
3.4.2. Gravedad de la adicción a cocaína.....	45
3.5. Determinación de parámetros bioquímicos.....	45
3.5.1. Obtención y procesamiento de la sangre.....	45
3.5.2. Cuantificación de mediadores inflamatorios.....	46
3.5.3. Cuantificación de factores de crecimiento y proteínas relacionadas.....	47
3.5.4. Cuantificación de derivados de ácidos grasos en plasma.....	48
3.6. Estadística.....	49
3.6.1. Análisis de distribución.....	50
3.6.2. Análisis de medias.....	50
3.6.3. Análisis de correlaciones.....	50
3.6.4. Análisis de regresión logística y curvas ROC.....	50

### IV. RESULTADOS

4.1. Artículo I. <i>"Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity"</i> .....	52
4.2. Artículo II. <i>"Plasma Concentrations of BDNF and IGF-1 in Abstinent Cocaine Users with High Prevalence of Substance Use Disorders: Relationship to Psychiatric Comorbidity"</i> .....	80
4.3. Artículo III. <i>"Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings"</i> .....	101

### V. DISCUSION

Estudio I.....	119
Estudio II.....	123
Estudio III.....	127

### VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES TESIS DOCTORAL.....	132
----------------------------------	-----

### VII. ANEXO

Anexo. Publicaciones científicas.....	134
---------------------------------------	-----

### VIII. REFERENCIAS

Bibliografía.....	136
-------------------	-----





## PREFACIO

La gran prevalencia de las enfermedades crónicas se ha convertido en una de las características de las sociedades modernas. Y de entre todas ellas, las adicciones a drogas se han erigido en un problema social de primera magnitud, tanto por su repercusión sobre la salud de los adictos, como por el enorme impacto social y económico que suponen. Sorprendentemente, las adicciones constituyen todavía uno de los dilemas más grandes para la salud pública, en especial por la falta de instrumentos de estratificación de los pacientes y de abordaje terapéutico. De hecho, en muchos sistemas sanitarios occidentales ni siquiera se las considera enfermedades. A este problema hay que añadir el hecho de que las adicciones suelen tener una abigarrada patología médica asociada que condiciona el abordaje preventivo, médico y de reinserción del adicto. En este sentido es esencial fenotipar correctamente a los pacientes adictos, buscando no solo elementos clínicos subjetivos (síntomas), sino también pruebas biológicas objetivas (por ejemplo, biomarcadores), que nos puedan ayudar a entender la idiosincrasia de cada adicción y proporcionar un marco científico estable desde el que combatir el abuso de sustancias con eficacia. La presente tesis doctoral aborda el problema de la fenotipación clínica objetiva de la adicción a cocaína, evaluando el significado de varios biomarcadores objetivos como elementos de mejora en el diagnóstico y estratificación de su adicción.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La adicción

La adicción es un trastorno primario de los sistemas cerebrales de recompensa y afecta a circuitos relacionados con la motivación y la memoria. Las disfunciones en estos circuitos conducen a unas manifestaciones características a todos los niveles: biológicas, psicológicas, sociales y espirituales. Esto se refleja en la búsqueda de recompensa del individuo y/o el alivio de síntomas negativos. La adicción se caracteriza por la pérdida del control sobre el comportamiento y la necesidad de consumo incontrolada, minimización de la capacidad de reconocimiento de problemas graves en el comportamiento y las relaciones interpersonales, así como una respuesta emocional disfuncional. Como en otras enfermedades crónicas, la adicción implica ciclos de recaídas y remisiones. Sin el tratamiento o compromiso en actividades orientadas a la recuperación, la adicción es progresiva y puede derivar en incapacidad o muerte prematura (*EMCDDA Insights Series No 14, Models of addiction*, EMCDDA 2013).

La adicción a drogas se define como un trastorno crónico recidivante en el cual el comportamiento compulsivo de búsqueda y consumo de una sustancia persiste a pesar de las serias consecuencias para el individuo (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV-Test Revised*, American Psychiatry Association 2000). En sujetos adictos, el consumo de la sustancia se vuelve el tema principal en torno al cual gira su vida, aspecto central de su vida, en detrimento de la importancia de su trabajo, relaciones personales, situación económica, felicidad e incluso la propia existencia, perdiendo la capacidad de control de su estabilidad y supervivencia. Muchos adictos en busca de tratamiento, reconocen la naturaleza destructiva de su adicción, pero se sienten incapaces de cambiar su comportamiento compulsivo (Koob & Le Moal 2006). La evolución de la adicción se desarrolla como un proceso de adaptación fisiológico y psicológico. Aunque, algunos sujetos no desarrollan adicción tras el uso de sustancias de abuso. La vulnerabilidad al desarrollo de adicción a una o varias sustancias de abuso, estará favorecida por una compleja interacción de factores ambientales, genéticos, e individuales en cada caso. Cada paso en la progresión del proceso de adicción está caracterizado por diferentes características comportamientos, fisiológicas y moleculares (Kalivas 2005). La adicción es un proceso multifactorial en la cual se da una compleja combinación de factores que dan lugar a su desarrollo o protección ante la misma: (1) Vulnerabilidad genética, (2) impacto ambiental sobre la contribución genética (epigenética), (3) entorno social, (4) primeros contactos con las sustancias de abuso (edad precoz de inicio), (5) factores de riesgo y protección, (6) etapas vitales relevantes en la adicción y (7) comorbilidad psicopatológica.

Las sustancias de abuso poseen diversas características con mecanismos particulares de acción (Camí & Farré 2003). De acuerdo con las características intrínsecas de cada sustancia de abuso actuarán sobre diferentes dianas localizadas en la sinapsis. De forma común todas las sustancias adictivas comparten la activación de sustratos neurales que subyacen a los procesos de recompensa y refuerzo positivo, implicando al sistema dopaminérgico como elemento principal del circuito de recompensa.

### 1.1.1. Situación actual en Europa y España

Los primeros contactos con las sustancias son la puerta de entrada para el desarrollo de la adicción, aunque sin embargo no todos los consumidores iniciales llegan a ser adictos. Estudios epidemiológicos recientes indican que más de 80 millones de europeos han consumido alguna sustancia ilegal. Se estima que una cuarta parte de la población adulta de la Unión Europea ha consumido drogas ilegales en algún momento de su vida. En la mayoría de los casos se trata de cannabis (73,6 millones), siendo la cocaína la segunda sustancia más consumida (14,1 millones), las anfetaminas (11,4 millones) y el éxtasis (10,6 millones). Los niveles de consumo en algún momento de la vida varían considerablemente de unos países a otros, desde un tercio de los adultos en Dinamarca, Francia y el Reino Unido hasta menos de uno de cada 10 en Bulgaria, Grecia, Chipre, Hungría, Portugal, Rumanía y Turquía (Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades, EMCDDA 2014).

La cocaína, las anfetaminas y el éxtasis son los estimulantes ilegales más consumidos en Europa. Los datos de las encuestas ilustran las diferencias geográficas en las pautas de consumo de estimulantes en Europa. La cocaína es más prevalente en el sur y el oeste, las anfetaminas en los países del norte y centrales, y el éxtasis, con menores niveles de prevalencia, se consume más en los países del sur y el este.

La cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida en Europa, aunque la mayoría de los consumidores se concentran en un número restringido de países. Se estima que unos 2,2 millones de adultos jóvenes de 15 a 34 años (1,7 % de este grupo de edad) consumieron cocaína el año pasado. Estudiando las tendencias a largo plazo en Dinamarca, España y el Reino Unido se ha observado una leve disminución después del máximo alcanzado en 2008, aunque siguen siendo elevadas. En la mayor parte de los demás países, las tendencias se muestran estables o a la baja (Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades, EMCDDA 2015).

La cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida en Europa, aunque la mayoría de los consumidores se concentran en un número restringido de países, como ilustran los datos de una encuesta que muestran que su consumo es más prevalente en el sur y el oeste de Europa.

Se estima que unos 2,3 millones de adultos jóvenes de 15 a 34 años (el 1,9 % de este grupo de edad) consumieron cocaína en el último año. Muchos consumidores de cocaína toman esta droga en contextos recreativos, aumentando el consumo en los fines de semana y las vacaciones. Los datos de un análisis de las aguas residuales realizado en 2014 en varias ciudades europeas confirma las diferencias diarias de consumo. En muestras recogidas durante el fin de semana se encontraron concentraciones más altas de benzoilecgonina, el principal metabolito de la cocaína (Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades, EMCDDA 2014). Solo unos cuantos países notificaron una prevalencia en el último año del consumo de cocaína entre adultos jóvenes de más del 3 %. Entre estos países, España y el Reino Unido observaron una tendencia estadísticamente significativa de aumento en la prevalencia hasta 2008, mientras que luego esa tendencia cambió para quedar estable o disminuir.

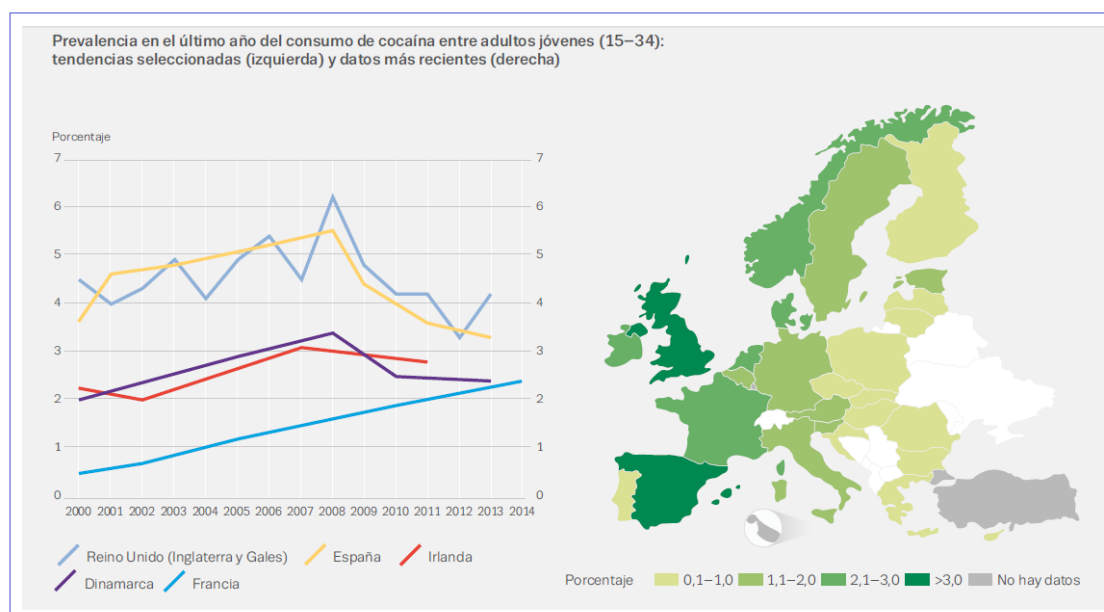


Figura 1. Prevalencia de consumo de cocaína. Informe Europeo sobre drogas (Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades, EMCDDA 2014)

En España se mantiene la tendencia descendente de la proporción de consumo de cocaína iniciada en 2005 (Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2013).

En 2011, el 8,8% de la población española en una edad comprendida entre 15-64 años habría consumido cocaína en polvo alguna vez en la vida. Se ha observado cómo cambia la tendencia ascendente que venía manifestándose desde hacía una década en consumo experimental y que alcanzó su máximo nivel en 2009 (10,2%). En inicio de 2007 se inició un descenso de los porcentajes, desde cifras de prevalencia máxima del 3,0% hasta el nivel de 2,2% que se observaron en 2012. Algo muy similar ocurre para los consumos en los últimos 30 días. En este caso, los años 2005 y 2007 marcaron máximos (1,6%) mientras que, en 2011, la prevalencia bajo a 1,1%. No obstante, la mayor reducción en este sentido se produjo en 2009, pasando de 1,6% a 1,2% (Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2013).

En España, la edad media de inicio en el consumo de cocaína en polvo se sitúa en los 21 años, acorde a la registrada en años anteriores. El inicio en el consumo de cocaína base es más tardío (22,4 años) y menos frecuente, también en descenso (Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2013). En términos generales, cabe destacar que el descenso experimentado en el consumo de cocaína (polvo y/o base), se hace fundamentalmente a expensas del consumo de cocaína en polvo, que es la mayoritariamente consumida.

La población española refleja como la situación socio laboral es un importante factor influyente en el consumo. En 2013, existe un mayor porcentaje de consumidores entre los parados que entre los empleados (dos parados por cada empleado). Destacar como grupo de

riesgo, los parados que buscan su primer empleo y concentran los porcentajes de consumidores más elevados, si bien es preciso tener en cuenta que este grupo está constituido fundamentalmente por personas jóvenes (Encuesta 2013-2014 sobre consumo de sustancias psicoactivas en el ámbito laboral en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2014). Desde 2007, se observa una tendencia descendente del consumo de cocaína en la población laboral en conjunto, y aunque disminuye tanto en empleados (3,5% en 2007) como en parados (5,4% en 2007), el descenso es mayor en este último grupo que partía de niveles más altos. Por lo tanto, la probabilidad de consumir cocaína es más elevada entre los parados que entre los empleados (Encuesta 2013-2014 sobre consumo de sustancias psicoactivas en el ámbito laboral en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2014).

Analizando el consumo de cocaína (polvo y/o base) en el último año por sexo, observamos que se trata de un hábito más extendido entre los hombres (3,6%) que entre las mujeres (0,9%), situación mantenida a lo largo de todas las ediciones según el (Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2013). No obstante, es importante señalar que la reducción experimentada en las prevalencias de consumo de esta sustancia se produce principalmente por una disminución del consumo entre los varones. La proporción de consumidores entre los hombres es 3,5 veces mayor que la observada entre las mujeres (Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías 2013).

Aún no se ha publicado la actualización del Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías de este año 2015. Los últimos datos sobre consumo de cocaína en los últimos 12 meses en España, datan según edad de un 2,2 entre edades de 18-64 años y 1,0 en edades comprendidas entre 15-17 años. Desde 2011 a 2013 disminuye ligeramente el consumo de las sustancias ilegales (Encuesta sobre alcohol y drogas en España EDADES 2013/2014 Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas 2015). La edad media de inicio en el consumo de las diferentes drogas se mantiene estable con respecto a ediciones anteriores de la encuesta, siendo de 21,3 años para consumo de cocaína en polvo (Encuesta sobre alcohol y drogas en España EDADES 2013/2014 Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas 2015 Datos evaluados en todo el territorio español, con un tamaño muestral de 23136 sujetos).

### 1.1.2. Fases de la adicción

El proceso de desarrollo de la adicción se produce en escalada, pudiendo diferenciarse varias etapas. Estas se han diferenciado en **uso**, **abuso** y **dependencia**. Entendemos por **uso** aquel tipo de relación con las drogas en el que, bien por su cantidad, por su frecuencia o por la propia situación física, psíquica y social del sujeto, no se detectan consecuencias inmediatas sobre el consumidor ni sobre su entorno. Comprende los primeros contactos con la sustancia, efecto negativo sobre el organismo, pero no pone en riesgo la vida del individuo o de las personas del entorno.

El uso continuado y cambio de patrón del mismo, deriva en un **abuso**. Este se define como aquella forma de relación con las drogas en la que, bien por su cantidad, por su frecuencia y/o por la propia situación física, psíquica y social del sujeto, se producen consecuencias negativas para el consumidor y/o su entorno. Se caracteriza por un incremento de patrón de consumo, incremento en la cantidad y de los periodos de consumo de la sustancia. Puede ser un uso ocasional y puntual de la misma pero por encima de los niveles de seguridad. La persona que abusa de la sustancia aun así logra tener periodos de control sobre la misma. Suele tener un componente contextual, es decir, cuando el entorno consume, el individuo también consume.

La administración repetida de una sustancia de abuso induce el desarrollo de un estado adaptativo denominado **dependencia** por el cual el individuo pierde el control sobre el consumo de la sustancia y se dan las adaptaciones fisiológicas del cuerpo.

Tanto el abuso como la dependencia conformarían los denominados trastornos por uso de sustancias (TUS) según el manual de referencia *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV-Test Revised* (DSM IV-TR) (*American Psychiatric Association, APA 2000*). El DSM-IV TRestablece el cumplimiento de una serie de criterios de abuso y dependencia para su diagnóstico. Para diagnóstico de TUS debe cumplir 1 criterio de abuso y/o 3 criterios de dependencia DSM IV-TR.

Criterios DSM-IV TRpara el abuso de sustancias:

(A) Abuso es un patrón desadaptativo de consumo de sustancias que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por uno (o más) de los ítems siguientes durante un período de 12 meses:

- (1) Consumo recurrente de sustancias, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa (p. ej., ausencias repetidas o rendimiento pobre relacionados con el consumo de sustancias; ausencias, suspensiones o expulsiones de la escuela relacionadas con la sustancia; descuido de los niños o de las obligaciones de la casa).
- (2) Consumo recurrente de la sustancia en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (p. ej., conducir un automóvil o accionar una máquina bajo los efectos de la sustancia).
- (3) Problemas legales repetidos relacionados con la sustancia (p. ej., arrestos por comportamiento escandaloso debido a la sustancia).
- (4) Consumo continuado de la sustancia, a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia (p. ej., discusiones con la pareja acerca de las consecuencias de la intoxicación, o violencia física).

(B) Los síntomas no han cumplido nunca los criterios para la dependencia de sustancias de esta clase de sustancia.

Respecto a los criterios de dependencia:

(A) Según el manual DSM-IV TRse define dependencia como un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

(1) **Tolerancia**, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

(a) Una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.

(b) El efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con su consumo continuado.

(2) **Abstinencia**, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

(a) El síndrome de abstinencia característico para la sustancia (los criterios diagnósticos para la abstinencia de sustancias específicas, suele ser una sintomatología opuesta al efecto gratificante inicial de la sustancia pues varía según las características químicas de la sustancia).

(b) Se toma la misma sustancia (o una muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

(3) La sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía.

(4) Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia.

(5) Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia (p. ej., visitar a varios médicos o desplazarse largas distancias), en el consumo de la sustancia (p. ej., fumar un pitillo tras otro) o en la recuperación de los efectos de la sustancia.

(6) Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia.

(7) Se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia (p. ej., consumo de la cocaína a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta de alcohol a pesar de que empeora una úlcera).

(B) Aunque no haya una duración específica de cada criterio por separado, se establece una persistencia y repetición en muchos de los criterios de dependencia.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), podemos entender la dependencia como aquella pauta de comportamiento en la que se prioriza el uso de una sustancia psicoactiva

frente a otras conductas consideradas antes como más importantes. El consumo de drogas, que quizás empezó como una experiencia esporádica sin aparente trascendencia, pasa a convertirse así en una conducta en torno a la cual se organiza la vida del sujeto. Este dedicará la mayor parte de su tiempo a pensar en el consumo de drogas, a buscarlas, a obtener financiación para comprarlas, a consumirlas, a recuperarse de sus efectos, etc. La dependencia a sustancias es un trastorno psiquiátrico caracterizado por el uso compulsivo de sustancias psicoactivas y por síntomas de abstinencia cuando la droga no es readministrada. Supone una necesidad psicológica y fisiológica de consumir una determinada sustancia. Los efectos son diferentes para cada tipo de sustancia así como la gravedad de la dependencia. Para el diagnóstico de una dependencia es importante la identificación de tres fenómenos fundamentales: tolerancia, abstinencia y **craving**.

El *craving* (término anglosajón) definido como un “deseo irresistible de consumir una determinada sustancia” (Tiffany 1990); Otra definición más amplia sería “la motivación de autoadministrarse una sustancia psicoactiva que previamente ha sido consumida” (Markou et al. 1993). El *craving* es un fenómeno dinámico muy difícil de controlar o gestionar, variando de unas personas a otras y que incluso en una misma persona es diferente según la situación y el tiempo de evolución de la dependencia.

## 1.2. La adicción a cocaína

La cocaína o benzoilmetilecgonina es un alcaloide tropano cristalino que se obtiene a partir del procesamiento de las hojas de la planta de coca (*Erythroxylum coca*). Es una sustancia estimulante del sistema nervioso central (SNC), supresor del apetito, y anestésico tópico. Originaria de países del noreste del sur de América, principalmente Perú y Bolivia. Se ha convertido en la sustancia psicoestimulante ilegal más consumida a nivel mundial, y uno de los mayores problemas socio-sanitarios en los países del sureste europeo, destacando el elevado consumo en España; así como los problemas de salud que se derivan de su adicción.

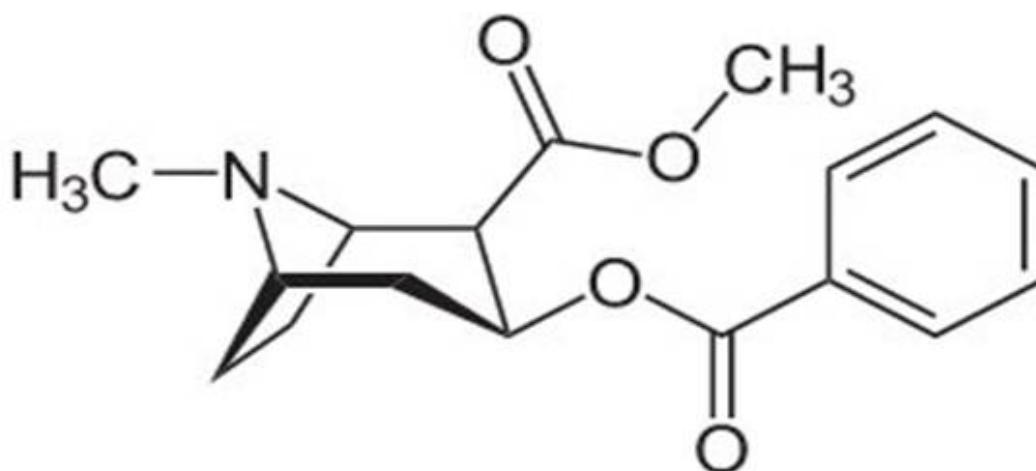


Figura 2. Estructura química de la cocaína.



La cocaína fue citada como droga principal por el 14 % de los consumidores que iniciaron tratamiento especializado en 2012 (55000) y por el 18 % de los que iniciaron tratamiento por primera vez (26000). Existen amplias diferencias entre los países, concentrándose el 90 % de los consumidores de cocaína en sólo cinco de ellos (Alemania, España, Italia, Países Bajos, Reino Unido). En conjunto, estos cinco países representan algo más de la mitad de la población de la Unión Europea. El número de pacientes que inician tratamiento por primera vez por consumo de cocaína como droga principal ha disminuido en los últimos años, ya que, tras el máximo de 38000 alcanzado en 2008, disminuyó a 26000 en 2012. Gran parte de esta disminución puede atribuirse al descenso producido en Italia; también España redujo levemente la demanda. El consumo principal es por vía intranasal o esnifada, aunque a veces se administra por vía parenteral, mientras que el crack habitualmente se fuma. En 2012, sólo un número pequeño (2300) de los consumidores que iniciaron tratamiento por primera vez en Europa lo hicieron por el consumo de crack como droga principal, concentrándose dos tercios de ellos en el Reino Unido y casi todos los demás en España y Países Bajos. Entre los consumidores habituales puede hacerse una amplia distinción entre los más integrados socialmente, que es posible que tomen la droga en un contexto recreativo, y los más marginados, que la consumen, a menudo junto con un opiáceo, en el contexto de un problema de drogodependencia crónico (EMCDDA 2014).

El principal problema que supone la adicción a cocaína es la falta de tratamientos psicológicos y farmacológicos efectivos para unos pacientes que además suelen presentar una alta comorbilidad psiquiátrica. El tratamiento de adicción a cocaína constituye un importante ámbito de investigación y plantea la necesidad del estudio en profundidad de los fenómenos subyacentes a la adicción, dada la falta de terapias efectivas para esta problemática. Existen evidencias científicas de que el sistema inmunológico está implicado en la patogénesis de la adicción, como prueba de la afectación de los diferentes sistemas en el organismo en un complejo proceso a todos los niveles del individuo (Marasco CC et al. 2014), así como su relación con el desarrollo de trastornos psiquiátricos comórbidos.

En el informe epidemiológico europeo sobre drogas publicado en 2014, se muestran una instantánea que refleja las características sociodemográficas generales de consumo de cocaína y solicitud de tratamiento, género más prevalente (84% masculino frente a 16% femenino), edad media de inicio de consumo (22 años) y búsqueda de tratamiento (34 años), patrón de consumo reflejado en Figura 3. Como se observa en la representación, se han encontrado marcadas diferencias entre los diferentes países de estudio.

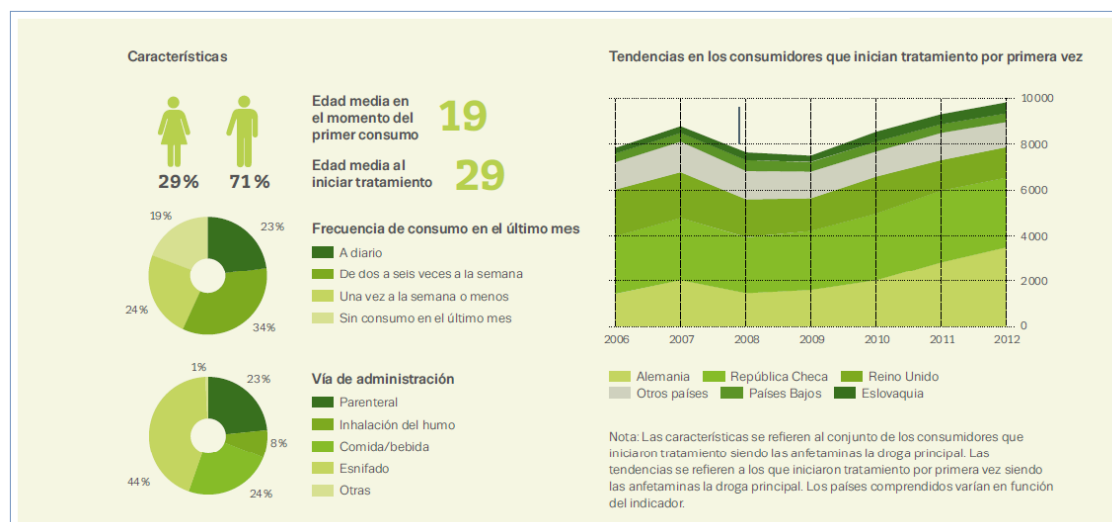


Figura 3. Informe Europeo solicitud de tratamiento por consumo de cocaína (Anual Report European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA 2014).

### 1.2.1. Neurobiología de la adicción a cocaína

Los efectos psicotrópicos agudos de la cocaína incluyen la estimulación locomotora, disminución de la fatiga, anorexia, locuacidad, mejora del rendimiento en la realización de tareas sencillas, ánimo hipertímico y euforia. La cocaína bloquea los sistemas de recaptación de dopamina (DA), serotonina (5HT) y, en menor medida, de noradrenalina (NA), aumentando la concentración sináptica de estas monoaminas (Rothman & Baumann 2003). Partiendo de evidencias científicas, sus efectos psicoestimulantes se deben fundamentalmente a sus acciones sobre la neurotransmisión dopaminérgica, dada la correlación entre la ocupación del transportador de dopamina (TDA) por la cocaína y sus efectos estimulantes de la locomoción (Cline et al. 1992). La cocaína actúa sobre los receptores como agonista de DA indirecto, produciendo un incremento de los niveles de DA extracelular por la inhibición de recaptación (Thomas, Kalivas & Shaham 2008; Haile et al. 2012); También bloquea la recaptación de 5HT y NA, elevando los niveles sinápticos de estos neurotransmisores y afectando a otros sistemas de señalización, incluyendo las transmisiones glutamatérgicas y gabaérgicas (Hall et al. 2004; Haile et al. 2012).

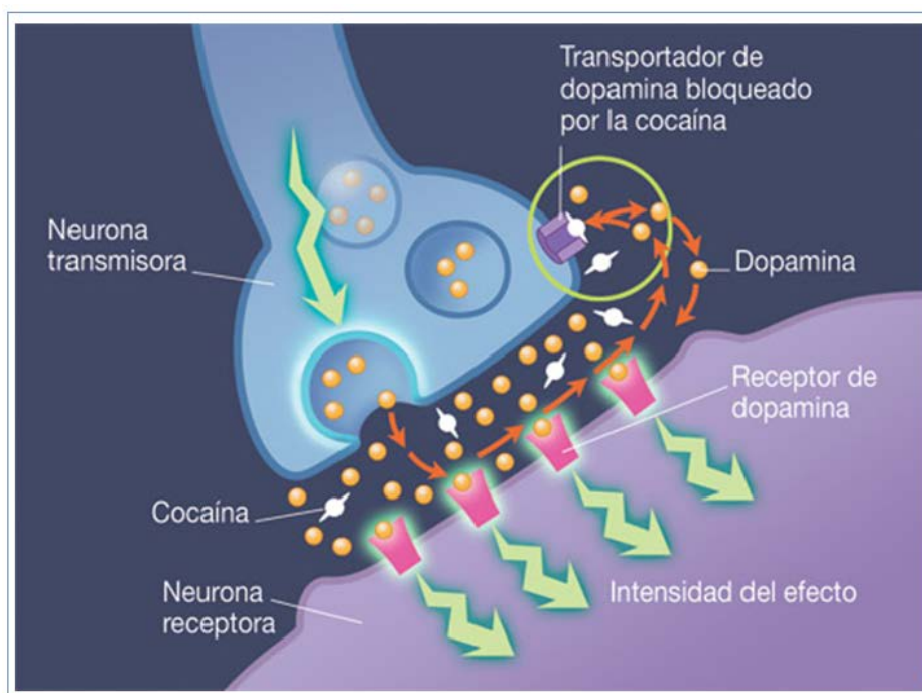


Figura 4. Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína bloquea el proceso de recepción de dopamina en el espacio intersináptico. Tomada de: *National Institute of Drug Abuse (NIDA)*, EE.UU. <http://www.drugabuse.gov>.

Se ha observado que la lesión de las neuronas DA de la vía mesocorticolímbica bloquea los efectos activadores de la locomoción de los psicoestimulantes (Kelly & Iversen 1976). Parece, también, que cambios en la neurotransmisión DA estarían implicados en los efectos reforzadores de la cocaína. Así, por ejemplo, se ha observado que la cocaína aumenta la concentración de DA en el núcleo accumbens, donde converge el sistema cerebral de recompensa (Sesack & Grace 2010), y que el grado de ocupación los receptores DA se relaciona con la intensidad de los efectos euforizantes de la cocaína (Kuhar et al. 1991; Volkow et al. 1997). Además, los animales *knockout* del TDA presentan prácticamente nula autoadministración de cocaína (Thomsen et al. 2009). Con el consumo crónico de cocaína, se ha observado un descenso en la disponibilidad de receptores DA que podría estar relacionada con el fenómeno de tolerancia a los efectos euforizantes (Volkow et al. 1990). Además, la disfunción DA tiene un papel capital en el síndrome de abstinencia, que ocurre cuando se interrumpe repentinamente el consumo de cocaína, durante la cual se ha observado una disminución de la síntesis (Trulson & Ullissey 1987) y liberación de DA en el núcleo accumbens (Weiss et al. 1992; Maisonneuve et al. 1995).

### 1.2.2. Complicaciones asociadas al consumo de cocaína

Los problemas de salud asociados al uso prolongado de cocaína incluyen complicaciones médicas derivadas, desde problemas cardiovasculares a trastornos psiquiátricos y neurológicos (Diercks et al. 2008; Herrero et al 2008; Degenhardt et al. 2011). Por otro lado, la compleja farmacología y farmacodinámica de la cocaína, comparte muchos mecanismos de acción con

otras drogas de abuso relacionadas con los circuitos de recompensa del cerebro, como por ejemplo las vías de proyección nigroestriatal y mesocorticolímbica. La amplia acción farmacológica de la cocaína sobre los sistemas monoaminérgicos ascendentes facilita el desarrollo de adicción a otras sustancias que también alteran estos circuitos, haciendo al individuo adicto a cocaína más vulnerable al policonsumo.

El consumo crónico de cocaína induce cambios neuroquímicos a largo plazo, cambios adaptativos estructurales y comportamentales como resultado de la alteración de expresión de genes y proteínas en áreas cerebrales que juegan un papel crítico en la adicción y recompensa (Thomas et al. 2008). Algunos de estos cambios no se recuperan totalmente a pesar de largo tiempo de abstinencia, y pueden ser representativos de los cambios neuroplásticos aberrantes inducidos por cocaína, relacionados con la dependencia a cocaína y el incremento de la vulnerabilidad a recaída al consumo incluso tras largos periodos de abstinencia (Haile et al. 2012; Robinson & Kolb 2004). Por otra parte, el uso de cocaína a largo plazo esta frecuentemente asociado con alteraciones en las funciones ejecutivas, deteriorando la competencia de los procesos emocionales y dando lugar a una elevada incidencia de trastornos psiquiátricos comórbidos, particularmente trastornos de estado de ánimo y ansiedad (Herrero et al. 2008; Reece et al. 2013; Araos et al. 2014).

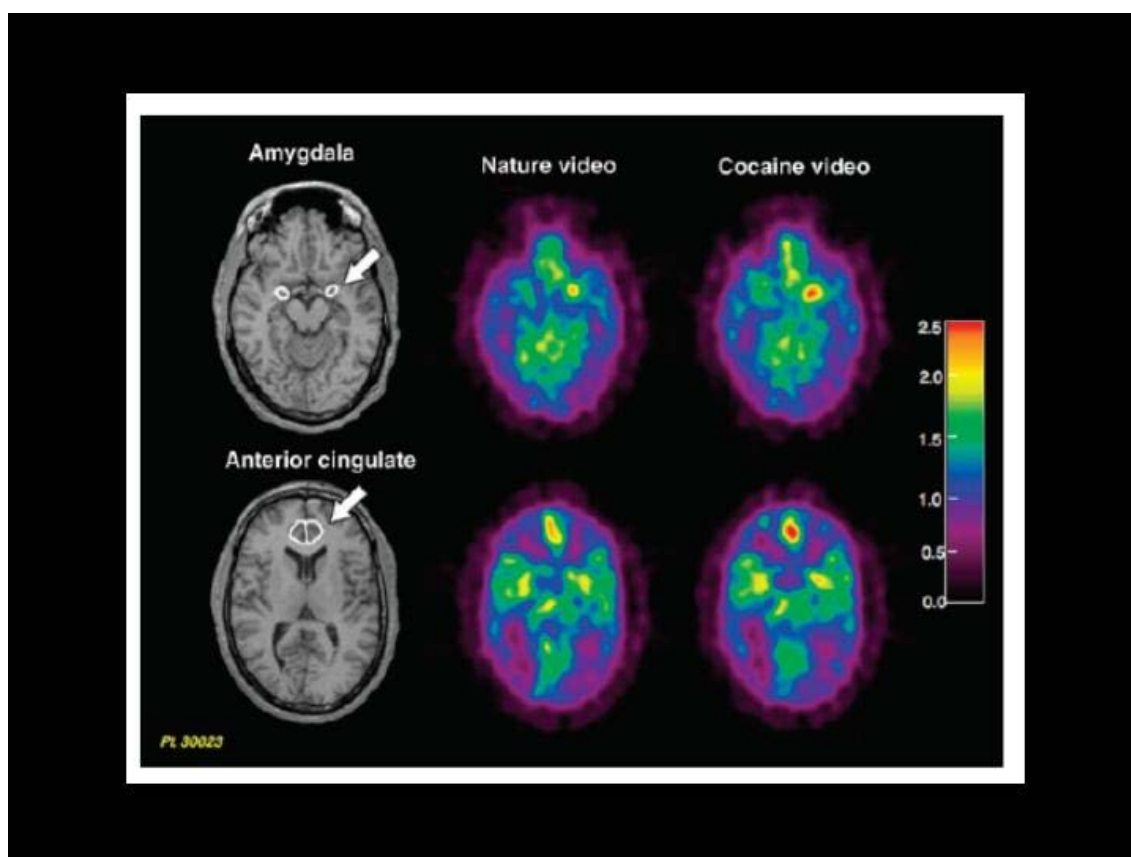


Figura 5. Imagen diferencias en neuroimagen de cerebro con consumo y sin consumo. Tomada de: *National Institute of Drug Abuse* (NIDA), EE.UU. <http://www.drugabuse.gov>

### 1.2.3. Diferencias sexuales en adicción a cocaína

Existen muchos factores que influyen en la adquisición, mantenimiento, y progresión de la adicción, como contexto social, edad, características genéticas y sexo (Adersen et al. 2012). Se encontraron diferencias sexuales respecto al consumo de cocaína y adicción, incluyendo inicio de consumo, progresión de abuso y dependencia, recaída tras la abstinencia y respuesta al tratamiento (Becker & Hu 2008; Bobzean et al. 2014). Los datos epidemiológicos sugieren que las mujeres presentan una escalada más rápida de consumo de droga y un progreso más rápido de la adicción a cocaína respecto a los hombres (Quinones-Jenab et al. 2012). Las mujeres son más sensibles a los estresores sociales, y las mujeres adictas a cocaína en abstinencia presentan más altos niveles de *craving* en respuesta a estímulos relacionados con cocaína (Robbins et al. 1999; Winhusen et al. 2013). El sexo también influye en el tratamiento y recaídas porque las mujeres muestran periodos más cortos de abstinencia y tasas más altas de recaída tras eventos estresantes o depresivos (Back et al. 2005). Todas las observaciones paralelas en modelo animal preclínico usando roedores, mostraron que las hembras son más vulnerables a los efectos relacionados con el abuso que los machos (Festa et al. 2004). A pesar de la evidencia de que las mujeres son más vulnerables a la adicción a cocaína que los hombres, los datos de consumo de cocaína son actualmente más elevados en hombres que en mujeres, y la proporción de consumidores de cocaína que solicitan tratamiento para cocaína en centros ambulatorios es aproximadamente de cinco hombres por cada mujer en Europa (EMCDDA 2012). Considerando que la adicción a cocaína esta comúnmente asociada a alteración de las funciones ejecutivas, deterioro de la capacidad de procesamiento emocional, y elevada incidencia de trastornos mentales comórbidos (Herrero et al. 2008), el sexo es el primer factor subyacente a estas complicaciones comportamentales. De hecho, las diferencias sexuales en psicopatología y TUS han estado relacionadas con la actividad hormonal, destacado la importancia de hormonas esteroides gonadales, ciclo menstrual, reactividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y factores neurobiológicos (Fattore et al. 2008; Fernandez-Guasti et al. 2012).

### 1.3. Comorbilidad psicopatológica

Las adicciones no son enfermedades sencillas. Se asocian en su mayoría a una elevada prevalencia de patologías asociadas, entre las que destaca la presencia de comorbilidad psicopatológica.

#### 1.3.1. Definición comorbilidad psicopatológica

Comorbilidad psicopatológica, también denominada “patología dual” es la denominación que se le da al diagnóstico simultáneo, en una misma persona, ya sea en el mismo periodo de tiempo o a lo largo del ciclo vital de una adicción y otro trastorno mental. La patología dual se define según la Sociedad Española de Patología Dual como: “La coexistencia o comorbilidad de un trastorno adictivo y otro trastorno mental, o la intersección de ambas disfunciones. Este modelo se basa en la interacción de una vulnerabilidad genética y biológica, favorecida por un

contexto ambiental o sucesos vivenciales, que predispone a diferentes fenotipos psicopatológicos, a la existencia de alteraciones que favorecen la aparición de trastornos.” Se han desarrollado diferentes teorías explicativas de la aparición simultánea o en la misma persona de dos o más trastornos.

Existe un debate sobre la causalidad de estos trastornos que ha dado lugar a diversas hipótesis explicativas (Torrens & Martínez 2009).

(A) **Hipótesis de la automedicación.** Trastorno mental primario o previo al consumo y TUS subsecuente. La existencia de un trastorno mental preexistente determina la aparición de un TUS. Esta hipótesis plantea que los sujetos con enfermedades mentales pueden comenzar, por ensayo y error, a usar y abusar de sustancias como tentativa de automedicación y aliviar así los síntomas de la enfermedad, con lo que se enfrentan a un riesgo añadido, que es el desarrollo de la adicción. La sintomatología del trastorno y los efectos de la sustancia de consumo se complementan. Podemos encontrar ejemplos prevalentes como el trastorno de depresión mayor (TDM) y consumo de cocaína o el caso de trastorno por hiperactividad y cannabis. Este enfoque explicativo también se denomina en el ámbito psiquiátrico “Modelo del trastorno psiquiátrico primario”: se caracteriza porque el segundo trastorno aparece para mitigar los problemas asociados al primero. Se propone que, mediante la resolución del primero, el segundo trastorno desaparece.

(B) **Hipótesis: El TUS deriva en enfermedad mental.** Otra hipótesis explicativa es la de la existencia de un TUS preexistente; el cual determina la aparición de un trastorno mental. Esta hipótesis se basa en la causalidad, en la cual, el consumo de una sustancia favorece la aparición de un trastorno. Pudiendo ser trastornos latentes o derivados del consumo y sus daños. También denominado “Modelo del trastorno por dependencia de sustancias primario”: el primer trastorno influye en el desarrollo del segundo y, una vez instaurado el segundo, se desarrolla con curso independiente. Ambas condiciones deben ser tratadas durante todo el tiempo que sea necesario.

(C) **Hipótesis de trastornos independientes o paralelos.** Ambos trastornos no están relacionados o constituyen trastornos independientes. Pudiendo tener puntos comunes o compartidos por el sustrato biológico subyacente común. Pero, no basados en una relación de causalidad. Dos o más factores independientes entre sí: cada uno de ellos tiene cursos clínicos diferentes y tratamientos independientes. Esta concurrencia puede explicarse por: (1) Modelo de la independencia biológica: ambos factores son independientes. (2) Modelo del factor común: ambos trastornos son consecuencia de los mismos factores predisponentes; como, p. ej., estrés, influencias genéticas, ambiente durante la infancia, etc.

En conclusión, es fundamental en primer lugar la detección de síntomas psicopatológicos en el contexto de evaluación de pacientes con problemas derivados del consumo de sustancias. En la práctica, es de relevante importancia la definición del diagnóstico individual de cada caso. La dificultad erradica en la compleja diferenciación temporal, dado que la sintomatología de una enfermedad no empieza en un momento temporal concreto ni el consumo de la sustancia. Los procesos no se dan de forma aislada e independiente, por lo tanto pueden darse varias posibilidades o diferentes formatos de interacción en un mismo paciente. Pudiendo ser ambos trastornos, la parte observable de un común denominador desconocido. Siendo trastornos con

una sintomatología común y compartiendo un sustrato biológico que es la parte observable y medible. En el ámbito de tratamiento es importante la identificación de trastornos comórbidos y valoración de si uno está manteniendo el otro. Por lo tanto, es necesario realizar un diagnóstico diferencial protocolizado para determinar si la presencia de psicopatología es provocada por la intoxicación o abstinencia, es independiente al consumo o, por el contrario, es inducida por el mismo (Torrens 2008; Vergara et al. 2012). Debemos entender ambas enfermedades como entidades dinámicas interrelacionadas, que se influyen y retroalimentan entre sí, para comprender y optimizar los tratamientos, de forma personalizada y pormenorizada en las diferencias individuales. El diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica es un punto de relevante consideración para la efectividad de terapias de tratamiento para la adicción a cocaína. Sin embargo, la evaluación y diagnóstico preciso de los trastornos psiquiátricos comórbidos en adictos a cocaína es complejo, dados dos problemas, los efectos de la cocaína pueden encubrir síntomas de otros trastornos mentales y el diagnóstico está definido por las manifestaciones en lugar de directamente por biomarcadores (Torrens et al. 2006).

### **1.3.2. Comorbilidad psiquiátrica en la adicción a cocaína**

La actual prevalencia de uso de cocaína, principalmente esnifada, está produciendo un número creciente de solicitudes de tratamiento en centros por uso y dependencia en los países más afectados (Roncero et al. 2012). Destacan entre los problemas de salud asociados al uso prolongado de cocaína, los trastornos psiquiátricos y neurológicos (Diercks et al. 2008; Herrero et al. 2008; Degenhardt et al. 2011). La exposición al uso de cocaína, se relaciona con comorbilidad psicopatológica, (Roncero et al. 2001). La evidencia de diversos estudios epidemiológicos data la elevada comorbilidad psicopatológica en población consumidora, siendo mayor en sujetos en tratamiento, y esta presencia concomitante de varios trastornos tiene implicaciones clínicas, evolutivas y terapéuticas relevantes (Regier et al. 1990; First et al. 1996; Kessler et al. 2007; Compton et al. 2007). Pero la realidad es que la relación entre ambos trastornos no ha estado establecida con claridad y el diagnóstico es complejo. Se desconocen las interacciones de ambas patologías y no disponemos de reglas universales para el diagnóstico. El solapamiento de síntomas deriva en una gran dificultad en la distinción entre trastornos primarios e inducido, dificultando el establecimiento de un diagnóstico principal y por lo tanto el tratamiento más eficaz.

Las psicopatologías más prevalentemente asociadas al desarrollo de TUS son:

(A). **Trastornos del estado de ánimo.** El trastorno más prevalente es el TDM, asociada a consumo de cocaína y alcohol. Múltiples estudios epidemiológicos muestran la alta prevalencia comórbida de trastornos afectivos y el consumo de sustancias. La prevalencia de psicopatología en población consumidora de cocaína es elevada, oscilando entre un 30-60 % (Falck et al. 2004; Herrero, Domingo-Salvany, Brugal, Torrens e Itinere Investigators 2008; Vergara-Moragues et al. 2012). Además, la existencia de TDM se asocia con peor curso clínico en los pacientes con TUS (Hasin et al. 2002). En un estudio de seguimiento prospectivo durante 6 años en muestras de pacientes dependientes de sustancias, donde se analizan los factores relacionados con la recaída en el consumo, se concluye con la existencia de dos factores de



predicción de recaída significativos: edad de inicio de consumo precoz (Grant 1995; Kessler et al. 1994) y presencia de episodios TDM (Landheim et al. 2006). En esta línea, mencionar el trabajo realizado por Brady y Sinha (Brady & Sinha 2005), consistente en una revisión sobre los conocimientos actuales de la neurobiología de los trastornos duales. En ella se muestra la existencia de mecanismos neurobiológicos comunes entre los TDM y los TUS. En los TDM hay alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario y en el factor liberador de corticotropina (CRF), así como en sistemas como el de las catecolaminas, 5HT, GABA y el glutamato. También la neuroadaptación asociada al uso crónico continuado de tóxicos está asociada a disfunciones en estos circuitos de neurotransmisión, especialmente en estados de abstinencia aguda.

(B). **Trastornos de ansiedad (TA):** ansiedad generalizada, trastorno de pánico, estrés postraumático, fobias, etc. asociadas a consumo de nicotina, cannabis y tranquilizantes. La prevalencia de diagnóstico de TA encontrada a lo largo de la vida en pacientes consumidores de cocaína fue del (22,7%) en Los pacientes en población española. Los pacientes con TA son vulnerables a desarrollar otras patologías comórbidas (Araos et al. 2014). Dentro de este grupo de trastornos de espectro ansiedad, destaca la elevada prevalencia de trastorno por estrés post traumático (TEP) (10%), algunos estudios hablan de prevalencias aún más altas en pacientes con trastornos por uso de sustancias y TEP, entre un 25% a 42% (Jacobsen, Southwick y Kosten 2001) se plantea la hipótesis de la relación entre la alta prevalencia en TEP y su relación con la vivencia de sucesos ambientales traumáticos y por lo tanto elevados niveles de estrés (Back, Dansky, Carroll, Foa y Brady 2001; Najavist et al. 2003) la presencia de diagnóstico TEP está asociado a una mayor gravedad de la psicopatología y un peor pronóstico (Back et al. 2005). Creemos que en nuestra población de estudio podrían influir factores socio-demográficos que precipitarían la probabilidad de desarrollar un TEP.

Por otro lado, se han realizado estudios epidemiológicos en EE.UU. de amplia muestra que mostraron una elevada asociación entre los distintos TA y los TUS (Merikangas et al. 1998). Datos provenientes del *National Comorbidity Survey Replication* señalan, que el 27% de pacientes con trastorno de pánico (TP) sin agorafobia sufren un TUS comórbido y esa comorbilidad asciende al 37,3% en el caso del TP con agorafobia (Kessler et al. 2007). De igual modo, la encuesta epidemiológica *National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions* (NESARC) encuentra prevalencias en el último año de comorbilidad entre TUS y TA en torno al 18%, siendo la fobia específica la comorbilidad más frecuente (10,5%). No obstante, los trastornos que presentan mayor riesgo relativo de aparecer comórbidamente en población con consumo de sustancias respecto a la población no consumidora son: TP con agorafobia trastorno de ansiedad generalizada (TAG) y el TP sin agorafobia (Grant et al. 2004).

Es una realidad constatada la implicación de la respuesta de estrés como factor clave en la etiopatogenia de la adicción, así como de las recaídas, habiéndose incluso demostrado cómo la exposición a situaciones estresantes en la infancia o la presencia de estrés crónico en las primeras etapas o a lo largo de la vida derivan en un mayor riesgo de comportamientos adictivos, aumentando la percepción de la recompensa por consumo de sustancias de abuso (Cleck & Blendy 2008). Algunos circuitos cerebrales y mecanismos neurobiológicos implicados en estrés se relacionan con desarrollo de TUS. Existe una relación en el sustrato subyacente común, dado que el sistema dopaminérgico mesolímbico tiene su origen en los cuerpos celulares del área tegmental ventral que emiten proyecciones hacia el núcleo accumbens, la



amígdala y la corteza prefrontal. Los efectos reforzadores positivos asociados al consumo agudo de drogas de abuso se producen debido al incremento de liberación de DA en el núcleo accumbens y también al efecto simultáneo producido, sobre las áreas telencefálicas, por los cambios generados en otros sistemas de neurotransmisión (gabaérgica, opioideérgica, glutamatérgica y serotoninérgica, entre otros) (Leshner & Koob. 1999), que a su vez están implicados en la respuesta al estrés y la ansiedad. Destacar la relación establecida entre la escalada de consumo, de uso inicial a dependencia (cronificación de consumo), y la disfunción del sistema cerebral de recompensa caracterizada por un descenso en la liberación de DA en dicho circuito tras el consumo de la sustancia (Schultz et al. 1997).

(C). **Trastornos del espectro psicótico.** Son pacientes que padecen esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante entre otros. Principalmente se relaciona con consumo de sustancias activadoras del SNC, como la nicotina y cafeína dentro de las legales y destacando la cocaína dentro de las ilegales. En población española la prevalencia de trastornos psicóticos encontrada en esta población consumidora de cocaína en tratamiento ambulatorio es especialmente relevante siendo en su mayoría, trastornos inducidos por el consumo de cocaína (Araos et al. 2014). Los sujetos con este diagnóstico son más vulnerables a desarrollar una dependencia de sustancias. Los datos epidemiológicos así lo demuestran, aunque no todos los estudios aportan cifras similares (Green 2002), pudiendo deberse a diferencias en la identificación de los diagnósticos, utilización de distintos criterios, instrumentos utilizados, población estudiada, etc. El primer estudio sobre comorbilidad con esquizofrenia en una muestra amplia fue la *Epidemiological Catchment Area* (ECA) (Regier et al. 1990), realizado con una amplia muestra que confirmó que más del 47% de los pacientes con diagnóstico de esquizofrenia había presentado un diagnóstico comórbido por TUS a lo largo de la vida. En un estudio más reciente, también específico de pacientes psicóticos (*Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness*), señala que el 60% de pacientes presentaba un TUS, y el 37% describía un consumo activo (Swartz et al. 2006). En población española, se publicó un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia, diagnóstico y actitud terapéutica de la patología dual en la comunidad de Madrid, 2008, con una muestra de 837 pacientes atendidos tanto en la red de salud mental como en la de drogodependencias, encontró que el 53% cumplían criterios de patología dual y el 11% eran psicóticos. Las prevalencias del resto de sustancias varía mucho (Buckley 1998). El consumo de psicoestimulantes, incluyendo la cocaína, se ha estimado alrededor de 4 veces más frecuente en pacientes con esquizofrenia que en sujetos sin diagnóstico (Roncero et al. 2007). Entre estas sustancias, las anfetaminas se consideran la sustancia de referencia dada su preferencia, aunque el consumo de la cocaína es más prevalente (Patkar et al. 1999). Estas sustancias se caracterizan por aumentar los niveles de DA en el espacio sináptico. Los pacientes con esquizofrenia podrían utilizarlos por su efecto terapéutico para paliar la sintomatología psicótica, (Roncero et al. 2007), para mejorar el humor e incrementar la sensación de energía y claridad de pensamiento (Baigent et al. 1995). La prevalencia del consumo de cocaína en los pacientes con esquizofrenia varía entre el 22 y el 31%, según estudios (Batel 2000), aunque algunos estudios reflejan cifras más elevadas, en torno al 50% (Buckley 1998). Desafortunadamente, poco se sabe sobre los procesos neurobiológicos subyacentes a los trastornos del espectro psicótico, pudiendo relacionar ambos trastornos por su complementariedad. Parece que los pacientes con esquizofrenia podrían consumirla para

mejorar su estado afectivo, ya que, paradójicamente, se ha sugerido que la cocaína podría reducir la sintomatología positiva y negativa y mejorar los síntomas depresivos (Laudet et al. 2000). El problema deriva en la disminución de la eficacia de los neurolépticos y aumento de efectos secundarios, como la distonía aguda y tardía (Van Harten et al. 1998). Los pacientes con esquizofrenia dependientes de cocaína tienen mayores niveles de *craving* en el periodo temprano de su tratamiento de la dependencia de cocaína que los pacientes sin esquizofrenia (Smelson et al. 2004). El patrón de uso de cocaína de los pacientes con esquizofrenia es más intermitente que en la población general, lo que se ha relacionado con las variaciones en la gravedad de la sintomatología positiva y negativa (North et al. 1998).

(D). **Trastornos de personalidad (TP)** o trastornos del Eje II. Los más prevalentes son trastorno límite y antisocial, asociados a policonsumo, destacando en éste la cocaína y el alcohol. Anteriormente, tenía un papel importante la heroína, pero a día de hoy es menos prevalente su consumo. A pesar de los avances en la investigación, sigue siendo poco clara la etiología de la relación entre trastornos adictivos y los TP. La alta prevalencia de consumo de sustancias en pacientes con TP ha sido reiterada en múltiples estudios. De hecho, la prevalencia de TP en muestras no clínicas oscila entre 10 y 15%, en pacientes psiquiátricos entre 45 y 80% y en adictos a sustancias de abuso en tratamiento 35 y 73%. Es decir, los TP son 4 veces más prevalentes en muestras de pacientes con consumo de sustancias de abuso que entre la población general (Verheul 2001). El amplio rango de variaciones en las prevalencias, según diferentes estudios, puede deberse a cuestiones como las características de las muestras (tamaño, género, edad, diferencias socioculturales), la sustancia primaria de abuso o condiciones de tratamiento. La elevada prevalencia, plantea que los TP y los TUS coinciden de forma mucho más destacada, sugiriendo que adicción y personalidad están relacionadas causalmente (Verheul 2001). Así, plantea potenciales relaciones causales, resumiendo que, tras diferentes conceptualizaciones y modelos sobre la posible relación entre ambas patologías, en la actualidad la etiología de la adicción se considera mejor descrita como modelos de estrés-diátesis bioconductual, en los que el inicio y evolución de la adicción resultaría de una interacción recíproca continua entre las vulnerabilidades biológicas y psicológicas y los recursos del individuo, por un lado, y sus circunstancias psicosociales, por el otro.

La evidencia actual sobre la importancia de la personalidad patológica en la etiología del uso de sustancias se desprende de: (1) Estudios que muestran alta comorbilidad entre TP y TUS; (2) Estudios longitudinales que destacan características de personalidad predictoras de consumo y posterior desarrollo de TUS; (3) Estudios retrospectivos que muestran que un elevado número de casos en los cuales, el diagnóstico psicopatológico precede al desarrollo de TUS.

Otro estudio mostró que se pueden distinguir, al menos, tres vías diferentes hacia la adicción, en las cuales los factores de personalidad tendrían un importante papel etiológico: la vía de la desinhibición conductual, la de la reducción del estrés y la de la sensibilidad a la recompensa, las cuales explicarían la mayor parte de la comorbilidad observada entre TP y TUS (Verheul & Van den Brink 2000): (1) La vía de la desinhibición conductual predeciría que los individuos que puntúan alto en rasgos como antisociabilidad e impulsividad y bajo en reserva o evitación del daño, característico de los TP, presentan más conductas de consumo de sustancias. Esta vía destacaría en la comorbilidad del trastorno antisocial de personalidad y, hasta cierto punto, la

del trastorno límite, y las sustancias más habitualmente relacionadas, serían cocaína y anfetaminas. (2) La vía de la reducción del estrés predeciría que individuos que puntuaran alto en rasgos como reactividad al estrés, sensibilidad a la ansiedad y neuroticismo son vulnerables a acontecimientos vitales estresantes, respondiendo con ansiedad y labilidad afectiva, lo que, a su vez, puede convertirse en motivo de uso de sustancias como automedicación. (3) La vía de la sensibilidad a la recompensa predeciría que individuos que puntúan alto en rasgos como búsqueda de novedades, búsqueda de recompensa, extraversión y gregarismo consumirían sustancias por sus propiedades reforzantes positivas. También diferentes estudios muestran resultados consistentes con esta hipótesis. Destacaría en la comorbilidad de los TP histriónico y narcisista, y las sustancias podrían ser la mayoría, aunque la elección de cocaína u otros estimulantes parecería la más congruente.

Estas vías propuestas podrían relacionarse con alteraciones en distintos circuitos neurales o sistemas de neurotransmisión: (a) La desinhibición conductual y la impulsividad podrían relacionarse primariamente con déficits serotoninérgicos; (b) La reactividad al estrés o sensibilidad a la ansiedad con excitabilidad neuronal aumentada por inhibición reducida desde el sistema glutamato-GABA; (c) La sensibilidad a la recompensa o la extroversión podrían relacionarse con hiperreactividad dopaminérgica u opioidérgica.

**(E). Trastorno por déficit de atención o hiperactividad (TDAH).** Existe una sólida interrelación entre el TDAH y los TUS. Los pacientes con TDAH presentan una elevada prevalencia de TUS. El TDAH es un trastorno complejo y multifactorial caracterizado por un patrón general de inatención, hiperactividad y/o impulsividad (DSM-IV TR, 2000; Biederman & Faraone 2005). Con frecuencia el TDAH no es identificado en la práctica clínica, especialmente en el caso de adultos que no han sido diagnosticados previamente durante la infancia o adolescencia. Como consecuencia es infradiagnosticado y por lo tanto el paciente no recibe tratamiento. El TDAH presenta una elevada comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos a lo largo de todas las diferentes etapas de la vida (Biederman et al. 1995; Secnik et al. 2005). En el adulto, los trastornos comórbidos al TDAH se observa una mayor prevalencia de trastornos de TP y de TUS (Biederman et al. 1995; Barkley & Gordon 2002; Mc Gough et al. 2005). Se ha estimado que, al menos, un 60-80% de pacientes con TDAH presenta otro trastorno psiquiátrico comórbido (Schubiner 2005; Biederman et al. 2004; Sobanski et al. 2007). La comorbilidad TDAH se asocia principalmente con un riesgo a de desarrollo de TUS, con una prevalencia de hasta el 68% (Wilens et al. 2003). Los pacientes con TDAH y TUS presentan una menor respuesta a tratamiento para adicciones, así como tasas más bajas de remisión y mayor cronicidad del TUS (Wilens & Upadhyaya 2007). La relación entre el TDAH y los TUS ha sido abordada por múltiples revisiones sistemáticas con metaanálisis (Charach et al. 2011; Lee et al. 2011) evidenciando que la existencia de un TDAH en la infancia se asocia con un significativo mayor riesgo de desarrollar un trastorno por uso de alcohol, nicotina u otras drogas en la adolescencia o en la edad adulta. La mayoría de datos sugieren que no hay diferencias de género en la comorbilidad de TUS en pacientes con TDAH (Elkins et al. 2007; Lahey et al. 1994). Se ha evidenciado una relación lineal entre la gravedad del TDAH y el riesgo o la gravedad del TUS (Kollins et al. 2005; Upadhyaya & Carpenter 2008). Respecto a adicción a cocaína y TDAH, estudios realizados con muestras clínicas han mostrado que entre el 10 y el 35% de sujetos con dependencia de cocaína presentan TDAH comórbido (Levin et al. 1998; Carroll 1993; Ros et al. 2004), habiéndose evidenciado que los niños con TDAH tienen significativamente más

probabilidades de desarrollar abuso o dependencia de cocaína en la adolescencia o edad adulta, aproximadamente el doble, que los niños sin TDAH (Lee et al. 2011). En pacientes con un trastorno por uso de cocaína, la presencia de TDAH se asocia, entre otras consecuencias, con un inicio más temprano en el consumo de cocaína, así como de nicotina, alcohol y cannabis (Carroll & Rounsaville 1993; Pérez de Los Cobos et al. 2011), con un consumo más frecuente y más grave de cocaína (Carroll & Rounsaville 1993) y con mayor comorbilidad psiquiátrica (Levin et al 1998).

Estudios en neuroimagen han permitido identificar anomalías funcionales y estructurales en diferentes áreas cerebrales, como los sistemas fronto-subcorticales o el circuito cíngulo-frontal-parietal, que también están involucrados en la neurobiología de los TUS (Wilens & Spencer 2010; Volkow et al. 2009). Estas y otras alteraciones neuroanatómicas permitirían explicar los déficits a nivel atencional, así como en los sistemas de motivación y recompensa que presentan los pacientes con TDAH (Volkow et al. 2009; Stark et al. 2011). El déficit de recompensa característico del TDAH se manifiesta por la aversión al retraso de la gratificación y por la preferencia por pequeñas recompensas inmediatas, y podría estar mediado por la menor disponibilidad de los receptores dopaminérgicos D2/D3 y del TDA en sujetos con TDAH en dos regiones cerebrales claves para los sistemas de recompensa y motivación (el núcleo accumbens y el cerebro medio). De hecho, la vía dopaminérgica del mesoaccumbens que proyecta desde el área tegmental ventral en el cerebro medio hasta el núcleo accumbens es clave en los fenómenos de recompensa y motivación (Koob & Volkow 2010) y parece subyacer a los déficits motivacionales y de recompensa observados en pacientes con TDAH, y por lo tanto su menor respuesta a la recompensa y su mayor vulnerabilidad al abuso de sustancias (Volkow et al. 2009). Por otro lado, diversos estudios con series amplias de sujetos han evidenciado una asociación entre el consumo de tabaco, alcohol y otras drogas por parte de la madre gestante y el riesgo del futuro niño en desarrollo de TDAH (Bhatara et al. 2006; Linnet et al. 2003).

En conclusión son múltiples los estudios que muestran la correlación del uso de cocaína con la elevada prevalencia de comorbilidad psicopatológica (Pavarin 2006; Gual 2007; Vergara 2010; Torrens et al. 2011). En España se han efectuado trabajos de investigación que asocian esta alta comorbilidad en usuarios de cocaína. La prevalencia rondaría entre un 30 a 65% en distintos tipos de poblaciones de estudio ( ). Se ha estudiado en diferentes poblaciones, desde comorbilidad psicopatológica en jóvenes usuarios de cocaína sin tratamiento en distintas latitudes; por ejemplo en Barcelona (Herrero et al. 2008), comorbilidad psicopatológica en pacientes con dependencia de cocaína tratados en comunidad terapéutica (Vergara et al. 2012), estudios epidemiológicos llevado a cabo en Estados Unidos, destacando un estudio epidemiológico realizado por el ECA, elaborado para estimar la comorbilidad de trastornos mentales con alcohol y otras drogas de abuso (Regier et al. 1990). Los resultados generales obtenidos para algún trastorno mental a lo largo de la vida en jóvenes usuarios de cocaína son de un 42,5%, un 65,6% para dependientes de cocaína en centros de tratamiento y un 76,1% en el estudio epidemiológico en población usuaria realizado en los Estados Unidos.

En la actualidad se sigue tratando la adicción desde diferentes prismas aislados entre sí. Dando por hecho la falta de eficiencia de cada uno de ellos por separado. Según estudios recientes en el ámbito científico, se concluye que se carece de tratamientos farmacológicos efectivos para

este tipo de trastorno (Amato et al. 2007; Minozzi et al. 2008; Lima-Reisser et al. 2009; Amato et al. 2011; Pani et al. 2011). Es necesaria una integración a la hora del abordaje de la problemática, un enfoque de la adicción más integral y holístico.

### **1.3.3. Neurobiología de la comorbilidad psiquiátrica en adicción a cocaína**

Dada la compleja farmacología y farmacodinámica de la cocaína, la cual comparte muchos mecanismos de acción con otras drogas de abuso relacionadas con los circuitos de recompensa del cerebro, como por ejemplo partes nigroestriatal y mesolímbica. Estos circuitos alterados se encuentran dañados en enfermedades mentales, comparten los mismos procesos observables o medibles, como el ejemplo de los trastornos de estado de ánimo, el más prevalente la depresión mayor. El efecto de la adicción como proceso es muy complejo y afecta a diferentes áreas del individuo. Un número creciente de estudios experimentales han estado tratando de definir la compleja farmacología que tiene la cocaína desde un nivel molecular hasta comportamental con la finalidad de prevenir la alta prevalencia de recaídas en el consumo después de periodos de abstinencia (O'Brien 2008). La adicción a cocaína induce una serie de cambios neuroquímicos, adaptativos y comportamentales de larga duración, se relacionan estos cambios con variaciones fisiológicas y de la expresión de proteínas en áreas cerebrales que juegan un papel relevante en el proceso adictivo y de recompensa (Thomas et al. 2008). Pudiendo ser el denominador común con los trastornos mentales, o creando unas condiciones de vulnerabilidad para el desarrollo de trastornos comórbidos.

Las propiedades gratificantes que tiene la cocaína son esenciales para el establecimiento de la adicción a esta sustancia. Tales efectos gratificantes son mediados por la liberación masiva de DA y por inhibición del transportador de esta, generando una acumulación de esta sustancia en el espacio sináptico en áreas como el núcleo accumbens. Actuando como un antidepresivo de acción corta. El problema es la farmacodinámica de la cocaína, ultracorta y por lo tanto se elimina rápidamente y esto deriva en la temprana necesidad de más cocaína. Pero a efectos farmacológicos, su acción neurofarmacológica es muy similar a los fármacos antidepresivos; Siendo la base de la hipótesis de automedicación, de un trastorno previo. Dada la similitud neurobiológica de la adicción a cocaína y los trastornos de estado de ánimo, destacando el TDM como trastorno comórbido más prevalente.

El consumo prolongado de cocaína afecta no solo a nivel neurológico, afectando los sistemas enzima monoaminoxidasa (MAO), sino también a los sistemas relacionados con la respuesta estrés, mediador por el CRF. Así como sistemas periféricos de regulación homeostática del individuo y respuesta a estados alterados o patogénicos.

<i>Sistemas primarios de neurotransmisión implicados</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>CRF</i></li> <li>• <i>Serotoninérgico</i></li> <li>• <i>Hipotálamo/extrahipotálamo</i></li> <li>• <i>Glutamatérgico</i></li> <li>• <i>Dopaminérgico</i></li> <li>• <i>Actividad MAO</i></li> </ul>
<i>Efectos en regiones cerebrales Primarias</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>↓ Actividad circuitos frontal-límbico</i></li> <li>• <i>↓ Actividad en cíngulo anterior</i></li> <li>• <i>↑ Actividad en amígdala</i></li> <li>• <i>↓ Niveles de MAO-A y MAO-B en cerebro de fumadores</i></li> </ul>
<i>Interacciones</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hallazgos neuroimagen en TDM y TUS</i></li> <li>• <i>Alteraciones comunes en la respuesta al estrés en TDM y TUS</i></li> <li>• <i>La inhibición de la MAO relacionada con fumar contribuye al efecto antidepresivo de fumar en TDM</i></li> </ul>

Tabla 1. Resumen de las alteraciones halladas en mecanismos neurobiológicos comunes en TUS y TD.

En los TDM, hay alteraciones en el eje hipotálamohipofisario y en el CRF, así como en sistemas como el de las catecolaminas, la 5HT, el GABA y el glutamato. También la neuroadaptación asociada al uso crónico continuado de tóxicos está asociada a disfunciones en estos circuitos de neurotransmisión, especialmente en estados de abstinencia aguda. En conclusión, existen los trastornos inducidos y los trastornos primarios, y justifican las tasas de comorbilidad entre TUS y TDM.

#### 1.4. Estudios clínicos. Instrumentos

Como se refleja en las diferentes definiciones de los organismos más actualizados y bajo los que se rige el diagnóstico-tratamiento y la investigación actual. Nos basamos en conceptos relativamente subjetivos y sujetos a una extensa variabilidad individual, desde la evaluación de la sintomatología definida por manuales diagnósticos estadísticos. A lo largo del tiempo, los criterios diagnósticos para trastornos mentales han ido evolucionando y desarrollándose, a medida que las investigaciones y el conocimiento avanzaba y daba nueva información basada en evidencia científica. Los criterios diagnósticos han cambiado y estos cambios también se han producido con respecto a la relación entre el consumo de sustancias y la presencia de otros síntomas psicopatológicos concurrentes (Torrens et al. 2006).

### 1.4.1. Los principales manuales diagnósticos de enfermedad mental

El DSM es el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la asociación americana de psiquiatría, el cual contiene una clasificación de los trastornos mentales. Este manual proporciona descripciones claras de las categorías diagnósticas, con el fin de que los clínicos y los investigadores de las ciencias de la salud puedan diagnosticar, estudiar e intercambiar información y tratar los distintos trastornos mentales. La edición con la que trabajamos es la cuarta, en su versión revisada (DSM IV-TR) (APA 2000). En octubre de 2014 se editó la nueva versión DSM-5. Por lo tanto, se deberán realizar las adaptaciones pertinentes en los instrumentos basados en dicho manual. No exento de controversia, tanto dentro del ámbito clínico como científico.

Por otro lado, la CIE-10 es el acrónimo de la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima versión correspondiente a la versión en español de la (ICD) siglas de *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*. El manual CIE-10 determina la clasificación y codificación de las enfermedades y una amplia variedad de signos, síntomas, hallazgos anormales, denuncias, circunstancias sociales y causas externas de daños y/o enfermedades. La CIE 10 se desarrolló por la OMS, en 1992 y se va actualizando cada tres años.

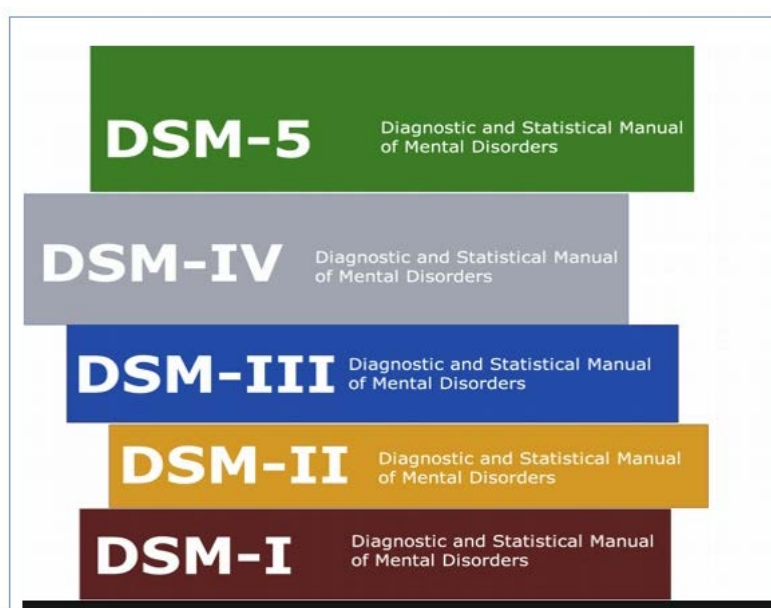


Figura 6. Imagen representativa de diferentes manuales diagnósticos estadísticos DSM y versiones actualizadas.

### 1.4.2. Instrumentos diagnósticos específicos población con problemas de adicción

En el ámbito clínico y de investigación, disponemos de distintas entrevistas diagnósticas semi-estructuradas y estructuradas basadas en los criterios diagnósticos del DSM-IV TRó CIE-10. Las más empleadas dado su valor psicométrico, validez y fiabilidad son:

(A). “*Structured Clinical Interview*” para Eje I DSM-IV (SCID-I) (First et al. 1999).



(B). “*Schedule for Clinical Assessment in Neuropsychiatry*” (SCAN) (OMS 1998).

(C). “*Composite International Diagnostic Interview*” (CIDI) (OMS 1998), (Janca et al. 1994)

(D). “*Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders*” para DSM IV (PRISM-IV) (Hasin et al. 2001).

### 1.4.3. Diagnóstico de Comorbilidad psiquiátrica

Revisando la bibliografía, no se encuentra evidencia científica de una relación causal entre los trastornos y consumo de sustancias. A medida que los manuales diagnósticos han evolucionado se ha dado por hecho la existencia de una relación, dada la elevada prevalencia comórbida, pero sin demostración científica de una interacción o causalidad con evidencia científica (Edward et al. 2006). Dando por hecho tal causalidad y derivando en instrumentos que definen los trastornos en sub-clasificaciones, como trastornos primarios e inducidos, basados en una relación temporal con el consumo de la sustancia. La primera nomenclatura diagnóstica utilizada en investigación psiquiátrica fue desarrollada en 1972 (Feighner 1972), utilizando una distinción primario-secundario para diferenciar trastornos primarios de los inducidos por una sustancia. Después se pasó a una distinción orgánico-no orgánico según “criterios de diagnóstico para investigación” (*Research Diagnostic Criteria* (RDC)). Los RDC son un conjunto de criterios diagnósticos psiquiátricos publicados a finales de la década de los 70 que fueron clave, pues el actual manual DSM-IV TR se basa en muchas de las descripciones del RDC.

La evolución fue progresiva, desde los criterios RDC (Spitzer et al. 1978), DSM III (APA 1981) y DSM III-R (APA 1987); el diagnóstico de la comorbilidad psiquiátrica se basaba en si la etiología del trastorno psiquiátrico era «orgánica» o «no orgánica», sin especificar criterios para su distinción. El término «orgánico» indicaba un trastorno mental causado con origen fisiológico, como derivado de enfermedad médica, neurológica o exposición a una toxina. Los estudios que se realizaron usando estos criterios diagnósticos mostraron escasa fiabilidad y validez para la mayor parte de diagnósticos psiquiátricos, principalmente trastornos afectivos y de ansiedad, cuando se estudiaban sujetos con TUS. Los criterios del DSM-IV (APA 1994) y DSM-IV TR (APA 2000) cambiaron la definición de conceptos, poniendo énfasis en la subcategorización para clasificar de forma más precisa. DSM-IV-TR establece una distinción primario-inducido por sustancias; Se crearon subgrupos según la relación entre el trastorno y el consumo de sustancias de abuso. (1) Primarios: trastornos mentales que no son inducidos por sustancias ni debidos a una enfermedad médica; (2) efectos esperados: síntomas considerados habituales que aparecen como consecuencia de la intoxicación o la abstinencia de una sustancia; (3) inducidos por drogas: síntomas considerados como excesivos en relación con los que suelen aparecer en los síndromes de intoxicación o de abstinencia por una sustancia. La entrevista PRISM basada en criterios DSM-IV TR establece el diagnóstico de trastorno primario e inducido en base a la relación de temporalidad entre el consumo en un patrón agudo o crónico y la aparición de sintomatología del trastorno psiquiátrico comórbido. La crítica al concepto de primario del DSM-IV TR es que la cronología no siempre tiene por qué crear el efecto, mientras



que el término independiente al consumo de sustancias se refiere a que una determinada condición psiquiátrica también puede identificarse en periodos de abstinencia. Actualmente, hay diferentes propuestas, como «independiente» en lugar del término «primario» (Schuckit 2006).

En la nueva versión del DSM-5, uno de los cambios es la sustitución del término primario por el de independiente (O'Brien 2012). La crítica fundamental a la distinción actual es que el término primario dé por supuesto que la sintomatología del trastorno siempre va a ser previa al consumo de sustancias. La introducción del concepto independiente se presupone que los síntomas también pueden estar presentes en épocas de abstinencia o posteriores al consumo. Las diferencias en los criterios diagnósticos reflejada en los instrumentos utilizados pueden originar diferencias en los resultados encontrados. Por lo tanto, la identificación de forma fiable y válida de la presencia de otro trastorno psicopatológico en sujetos consumidores de drogas es un punto relevante para los profesionales clínicos a la hora de establecer una línea efectiva de tratamiento; Dada la necesidad de disponer de criterios diagnósticos e instrumentos adecuados para afinar diagnóstico y relación entre trastornos que deriven en un tratamiento específico y eficaz.

La precisión de evaluación es importante también en otras áreas, como la epidemiología, donde es necesario poder realizar los diagnósticos de comorbilidad para poder planificar los recursos asistenciales necesarios con la finalidad de atender a esta población de forma efectiva (Vergara et al. 2012). Así mismo, para avanzar en el conocimiento de los factores etiopatogénicos implicados en las adicciones y los trastornos mentales es importante disponer de pruebas biológicas que posibiliten una mejor caracterización clínica de los sujetos. La realización de un diagnóstico en comorbilidad psicopatológica de individuos que están consumiendo sustancias psicoactivas plantea dos problemas fundamentales. Por un lado, el hecho de que los efectos agudos y crónicos de las drogas simulan síntomas de muchos de los trastornos mentales, dificultando la diferenciación entre los síntomas psicopatológicos de los efectos agudos del consumo o de la abstinencia de la sustancia de los propios de un trastorno psicopatológico primario o independiente. Por otro lado, el hecho de que los trastornos psicopatológicos son más bien 'síndromes o patrones de síntomas con algunas pruebas de validez clínica, que "enfermedades" con una fisiopatología conocida y con unos marcadores biológicos claros (Nunes & Hasin 1998).

### **1.5. Marcadores biológicos**

El diagnóstico específico y objetivo del paciente, evaluando TUS y comorbilidad psiquiátrica, es un punto importante para la comprensión de los procesos subyacentes y etiología de la adicción. Es necesario el estudio del sustrato biológico para la elaboración de tratamientos efectivos para la adicción a cocaína. Sin embargo, la evaluación del diagnóstico preciso de los trastornos psiquiátricos comórbidos en adictos a cocaína es complejo, dada la similitud de sintomatología de los trastornos mentales y los efectos de la cocaína, pudiéndose encubrir síntomas de otros trastornos mentales, ya que el diagnóstico está definido por las manifestaciones en lugar de pruebas biológicas objetivas (Torrens et al. 2006).

Focalizando en este punto, la búsqueda de biomarcadores fiables para ambos, trastornos psiquiátricos comórbidos y TUS, está causando un creciente interés para la investigación en psiquiatría de la adicción en los últimos años. Este crecimiento en investigación ha generado un número de posibles biomarcadores, principalmente involucrados en el sistema inmunológico y respuestas inflamatorias, los cuales requieren replicaciones en estudios más amplios (Domenici et al. 2010; Domenici & Mugliá 2007; Sinha et al. 2011).

Los biomarcadores se definen como marcadores biológicos o huellas objetivas, que indican una información observable y medible. Son indicadores de evaluación a nivel molecular, bioquímico o celular, en un organismo determinado. Como características necesarias, debe poder ser evaluado o medido objetivamente, revelando información sobre procesos biológicos concretos, como por ejemplo un estado patogénico o una respuesta a un tratamiento, que determine un cambio significativo. Entendiendo que los procesos fisiológicos interactúan dentro de sistemas dinámicos e interdependiente. El motivo de elección de estas moléculas, partiendo de estudios previos que las relacionan con procesos cerebrales relevantes y adicción, es la posibilidad de encontrarse en sangre periférica.

Nuestro grupo ha estudiado el perfil plasmático de derivados de ácidos grasos en sujetos consumidores de cocaína en abstinencia en tratamiento ambulatorio (Pavon et al. 2013). Así, varios derivados de ácidos grasos como los endocannabinoides (ECBs) y sus congéneres fueron planteados como posibles biomarcadores para TUS y trastornos psiquiátricos comórbidos (Pavon et al. 2013).

#### **1.5.1. Mediadores periféricos del sistema inmunológico. Citoquinas y quemoquinas**

Los mediadores de respuesta inmunológica son moléculas mediadoras de procesos inflamatorios involucradas en neurogénesis, remodelado neuronal y apoptosis. Recientes estudios mostraron que la neurogénesis está modulada por respuesta inflamatoria mediada por citoquinas como respuesta activadora del sistema inmune.

Las citoquinas son moléculas de bajo peso que regulan proteínas y glicoproteínas secretadas por varias células del cuerpo, incluyendo células blancas, en respuesta a estímulos inflamatorios (Dinarello 2000). Su origen celular es diverso. Algunas citoquinas se sintetizan en células endoteliales, epiteliales, fibroblastos o astrocitos. Pueden actuar sobre estos mismos u otros.

(1) Las denominadas interleuquinas (ILs) son secretadas por leucocitos actuando sobre otros tipos celulares. (2) Otro grupo son los interferones (IFNs) las cuales activan células *natural killers* y macrófagos (Fensterl & Sen 2009).

En el marco de este estudio hemos evaluado los niveles circulantes de proteínas de señalización pro-inflamatorias. En concreto, el grupo de citoquinas conformado por: factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), implicado en muerte celular (Sun & Fink 2007), interleuquina 1beta (IL-1 $\beta$ ), interleuquina 6 (IL-6); así como otros mediadores inflamatorios que actúan en cerebro. Citar la Interleuquina -10 (IL-10) la cual es una citoquina anti-inflamatoria.

Por otro lado, como parte del sistema inmune, merecen especial atención la familia de las quemoquinas, mediadores que actúan como quimio-atrayentes y están relacionados con el movimiento de leucocitos al lugar de la inflamación (Trecki & Unterwald 2009). Dentro de ellas: ligando 2 con el motivo C-C (CCL2) o proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y el ligando 12 con el motivo C-X-C (CXCL12); factor 1 derivado de células estromales (SDF-1); ligando 1 con el motivo (C-X3-C) (CX3CL1) o fractalquina, las cuales modulan células inmunes y glía.

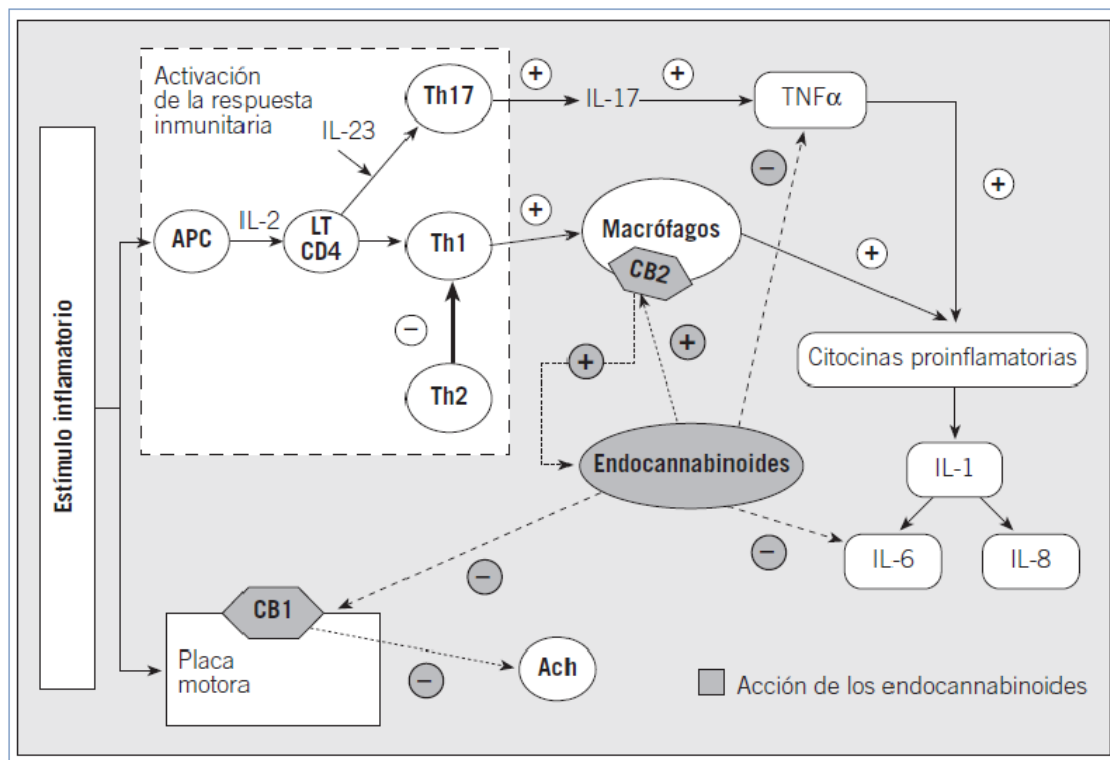


Figura 7. Esquema representativo respuesta inmunitaria. Interacción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. (Lucía Márquez et al. 2008)

Un estudio de revisión reciente, mostró que las citoquinas inflamatorias tenían funciones positiva y negativa en la proliferación y diferenciación neuronal. (Borsini et al. 2014). Este hecho refuerza la hipótesis de que la inflamación está relacionada con los mecanismos moleculares y celulares asociados a procesos cognitivos complejos y por consiguiente, alteraciones en la inmunología del cerebro como punto relevante en el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos (Borsini et al. 2014). Evidencias recientes sugieren que citoquinas, pero especialmente las quemoquinas, juegan un papel importante en el desarrollo neuronal, maduración, supervivencia y regeneración del SNC (Crews, Zou & Qin 2011). En particular, las células de la microglía están involucradas en la remodelación sináptica, un paso esencial en la consolidación del comportamiento y adquisición, y los receptores de quemoquinas expresados por la microglía son críticos para el desarrollo cerebral y el podado y remodelación de las conexiones sinápticas tanto en el desarrollo (*pruning* sináptico) como en la edad adulta (Paolicelli et al. 2011; Stuart & Baume 2014).

Numerosa bibliografía indica que la cocaína y otros psicoestimulantes alteran la producción periférica de mediadores inflamatorios en roedores (Di Francesco et al.1992; Wang Huang &Watson 1994; Rofael, Turkall & Abdel-Rahman 2003; Kubera et al. 2008) y en humanos (Halpern et al.2003; Yamada & Nabeshima 2004; Irwin et al. 2007), y como la cocaína perturba las funciones de células endoteliales, incluyendo la barrera hematoencefálica (Fiala et al.1998). Las señales circulantes inflamatorias podrían también influir en los cambios cognitivos y de comportamiento relacionados con la cocaína. Otros estudios en humanos han reportado que las acciones farmacodinámicas de las drogas de abuso son también producidas y potenciadas por la activación de señales del sistema inmunológico en áreas y vías relacionadas con los procesos de adicción (Coller & Hutchinson 2012). De hecho, varios estudios han mostrado la clara interacción entre SNC y sistema inmunológico en trastornos mentales como la depresión (Miller et al. 2009; Montgomery & Browers 2012), lo que sugiere que la neuroinflamación es un componente de la enfermedad mental. Como consecuencia, todas estas señales plasmáticas podrían ser clave para la comprensión de los procesos de desarrollo de la adicción a cocaína, así como de la gravedad de adicción a cocaína y/o trastornos psiquiátricos comórbidos en usuarios adictos a cocaína en tratamiento.

En el marco de este trabajo, hemos evaluado principalmente citoquinas pro-inflamatorias, partiendo de su relación con procesos neuroinflamatorios vinculados a adicción, así como con trastornos psiquiátricos prevalentes en población consumidora de cocaína. Destacando IL-6 y TNF- $\alpha$ , ambas involucradas en inflamación relacionada en pacientes depresivos (Zorrilla et al. 2001; Dowlati et al. 2010), se han relacionado con la gravedad de síntomas depresivos, como sueño perturbado, disfunciones cognitivas, y fatiga (Meyers 2005; Motivala et al. 2005). También se ha demostrado que IL-6 responde a estrés psicosocial agudo incluso en pacientes no depresivos, expuestos a estrés temprano durante los primeros años de vida (Carpenter et al. 2010). Este y otros estudios han mostrado la interacción entre sistema nervioso simpático (SNS) y los mecanismos por los cuales se activan las respuestas inflamatorias ante situaciones de estrés, estudiándose en un modelo animal, como las catecolaminas que actúan a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos y producen un incremento de expresión de citoquinas, tanto a nivel cerebral como periférico (Johnson et al. 2005). Estas catecolaminas son precisamente las que se ven afectadas directamente por el consumo de cocaína. La bibliografía reciente indica que el SNP está a su vez relacionado con regulación del sistema inmunológico (Tracey 2009) mediante efectos inhibitorios de inflamación o anti-inflamatorios. Algunas citoquinas como TNF- $\alpha$  poseen ambos efectos, y en otras como IL-10 solo se ha observado su efecto anti-inflamatorio. Por lo tanto estos mediadores reguladores serían como la influencia del Ying-Yang sobre la respuesta de inflamación en el SNS y SNP (Frasure-Smith et al. 2009).

No obstante no todos los mediadores inflamatorios que participan en cerebro han sido estudiados. En el presente trabajo nos hemos centrado en nuevas moléculas que han comenzado recientemente a tenerse en cuenta, como parte relevante en los procesos inflamatorios relacionados con trastornos mentales como depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, Alzheimer (Stuart & Baume 2014). Cabría destacar entre ellas la fractalquina, propuesta como reguladora de la proliferación celular en hipocampo (Stuart & Baune 2014; Stuart et al. 2014) e involucrada en los procesos celulares de plasticidad necesarios para la consolidación del fenotipo adicto (Mandyam & Koob 2012).

### 1.5.2. Moduladores de estado homeostático interno. Derivados de ácidos grasos

Los lípidos transmisores son derivados de ácidos grasos, generalmente moléculas generadas a partir de la membrana celular. Bioquímicamente estas sustancias conforman una familia de moléculas de señalización lipídica, que tienen un papel fundamental en la modulación de diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas en SNC y tejidos periféricos. Estos transmisores incluyen entre otros a aciletanolamidas y acilglicerol (Choi & Chung 2013).

Las aciletanolamidas, también denominadas N-aciltenolaminas, son derivados de etanolamida conjugados con ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. Por otro lado, los monoacilglicerol presentan un grupo glicerol unido a una cadena de ácido graso normalmente poliinsaturada.

(A) Las aciletanolamidas son unas señales endógenas de naturaleza lipídica que participan en diversas funciones fisiológicas, destacando el mantenimiento de la homeostasis energética (Mazzari et al. 1996; Rodríguez de Fonseca et al. 2001). Las principales aciletanolamidas son:

(1) Araquidoniletanolamida (anandamida (AEA)\*), derivada del ácido araquidónico. Presenta propiedades cannabimiméticas o efectos semejantes a los compuestos presentes en la planta *cannabis sativa* por su actividad en los receptores cannabinoides CB1 y CB2. AEA fue el primer endocannabinoide identificado (Devane et al. 1992).

(2) Oleiletanolamida (OEA), derivada del ácido oleico. Es un factor de saciedad, sin propiedades cannabimiméticas. Actúa sobre un factor de transcripción nuclear relacionado con procesos catabólicos (Rodríguez de Fonseca et al. 2001, Fu et al. 2003).

(3) Palmitiletanolamida (PEA), derivada de ácido palmítico. Es un mediador anti-inflamatorio y anti-nociceptivo que no actúa en los receptores cannabinoides (Calignano et al. 1998, 2001).

(4) Otras. Aciletanolamidas como Esteariletanolamida (SEA), docosahexaenoiletanolamida (DHEA) y dihomo- $\gamma$ -linoleoiletanolamida (DGLA) son moléculas menos estudiadas y cuyas funciones fisiológicas deberán de ser dilucidadas. Así como palmitoleoiletanolamida (POEA), y linoleoiletanolamida (LEA).

(B) Los acilglicerol son ésteres de glicerol con uno o varios ácidos grasos, de lo cual se deriva su nomenclatura.

(1) 2-araquidonilglicerol (2AG)\*. Es una molécula derivada de ácido araquidónico como la AEA, que actúa en el SNC y en la periferia principalmente en funciones relacionadas con el sistema inmunológico. Sus características principales derivan de su actividad sobre receptores cannabinoides CB1 y CB2.

(2) 2-linoleoilglicerol (2LG), es una molécula derivada del ácido linoleico con funciones desconocidas.

Los denominados ECBs son derivados de lípidos endógenos como ácido araquidónico que actúan sobre receptores del sistema endocannabinoide: CB1 y CB2. Como por ejemplo AEA\* y 2AG\*.

Estas moléculas se sintetizan a demanda, en base a la necesidad del medio (Di Marzo et al. 1994). Se liberan de forma dependiente de estímulo, y sus niveles tanto en plasma como líquido extracelular son cuantificables, lo que sugiere su papel como mensajeros intercelulares actuando en receptores que se encuentran alejados del lugar de síntesis y liberación (por ejemplo en terminales sinápticos), y con ayuda de transportadores plasmáticos como la albúmina, otorgándoles carácter funcional hormonal (Giuffrida et al. 2000; Rodríguez de Fonseca et al. 2001). Han sido muy bien conservados a través de la cadena evolutiva y se encuentran presentes en casi todos los tejidos.

Dado que estos transmisores están presentes en los sistemas de señalización de las sinapsis, como moduladores bioenergéticos, su síntesis e inactivación se ve afectada por la interacción de múltiples señales y moduladores dentro del SNC (Rodríguez de Fonseca et al. 2005).

Aunque las aciletanolamidas tienen una heterogénea gama de funciones, comparten vías y rutas de biosíntesis y degradación comunes que se han caracterizado en distintos tejidos, especialmente en neuronas. Se forman por una catálisis secuencial clásica mediante fosfodiesterasa-transacilación desde fosfolípido-glicerol mediante síntesis de acilfosfatidiletanolamidas (NAPE). Por otro lado, la degradación de las aciletanolamidas es producida principalmente por la amino-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), enzima unida a membrana. Esta hidrolasa está distribuida a través del organismo, con altas concentraciones en cerebro e hígado (Maldonado et al. 2006; Luchichi et al. 2010). *Los sistemas de inactivación o final de respuestas biológicas inducidas por aciletanolamidas constan de dos etapas, una primera de recaptación, mediada por un transportador de membrana, y una segunda etapa de hidrólisis*

Los acilglicerol se sintetizan a demanda por rutas diferentes a las aciletanolamidas. Así, la síntesis se produce principalmente por de la acción de una diacilglicerol lipasa (DAGL). Respecto a su degradación, los acilglicerol pueden degradarse mediante la actividad de una monoacilglicerol lipasa (MAGL). No obstante, en los últimos años se han identificado y caracterizado otras enzimas de síntesis y degradación alternativos gracias al uso de herramientas farmacológicas y modelos genéticos (ratones knockout principalmente) (Ueda et al. 2012).

Según los receptores sobre los actúan, se deriva la funcionalidad de la molécula. Por ejemplo, OEA y PEA actúan sobre receptor (PPAR $\alpha$ ) y receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), otros receptores y mecanismos de acción aún son desconocidos. Sin embargo, AEA y 2-AG actúan sobre los receptores cannabinoides CB1 y CB2, lo que le confiere su denominación como endocannabinoide.

Los endocannabinoides actúan sobre receptores cannabinoides del SNC y periférico. Los ECBs AEA y 2AG, ambos actúan como ligandos internos para receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y

2 (2-AG); (Di Marzo & Deutsch 1998). Específicamente, el 2-AG es un agonista completo de ambos receptores cannabinoides, y es el ligando principal (molécula de unión) para el receptor CB2.

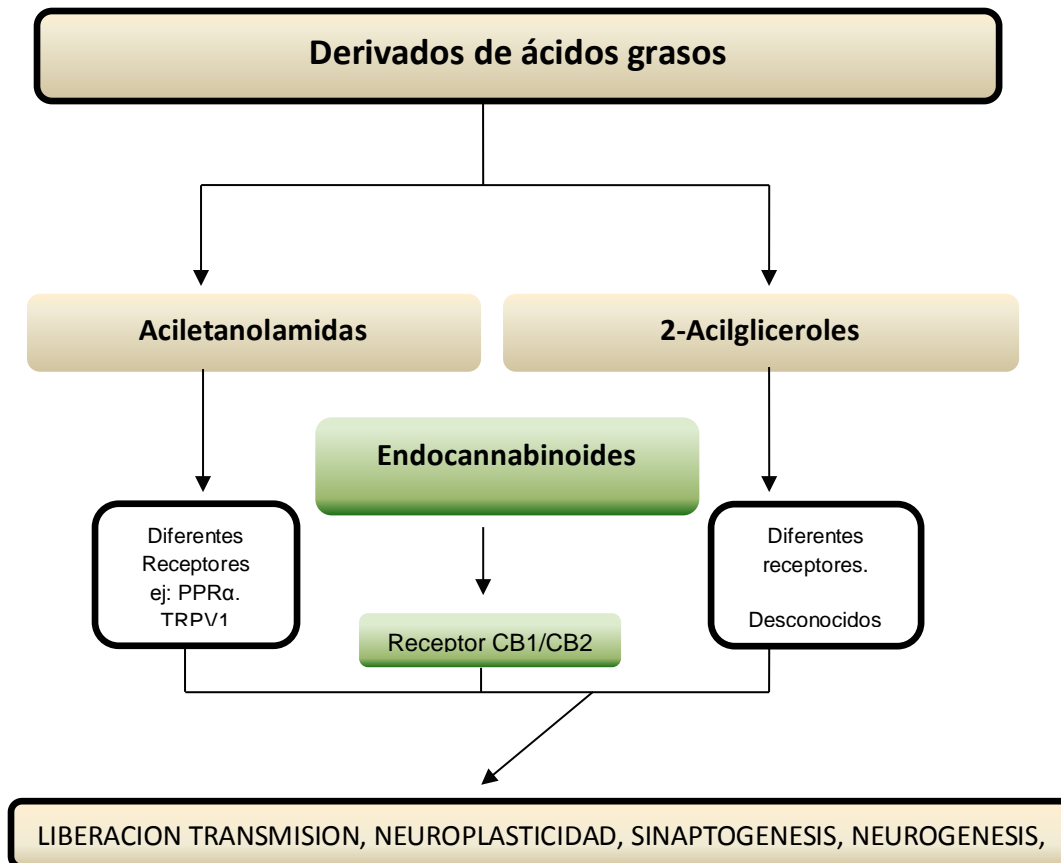


Figura 8: Esquema clasificación lípidos transmisores y sus receptores.

*En primer lugar se clasifican por su estructura química y por lo tanto rutas de síntesis y degradación. Pero, según sus receptores de acción se definirá su funcionalidad dentro del microambiente, a partir de esta información se crea una nueva clasificación. Aunque algunos receptores aún son desconocidos o algunos transmisores actúan sobre varios receptores.*

Estas moléculas actúan en el SNC, participando en diversos procesos periféricos como la regulación inmune, el sistema cardiovascular, los procesos endocrinos reproductivos y el control del metabolismo energético. En el SNC, estos lípidos han estado involucrados en los principales aspectos del procesamiento de información, incluyendo la liberación de neurotransmisores y aminoácidos, señalización retrógrada, plasticidad neuronal y sinaptogénesis (Rodríguez de Fonseca et al. 2005). Por lo tanto, dichas moléculas son claves en neurogénesis, funciones de células gliales, neuroinflamación y control energético celular. Estas moléculas pueden evaluarse en plasma periférico y a su vez tienen importantes funciones en cerebro, participando en procesos tales como el control del movimiento, la nocicepción, el

sistema de recompensa el aprendizaje, memoria y alimentación. Además, ejercen un papel importante en varios hechos relacionados con el desarrollo del cerebro (Solinas et al. 2008; Wegener et al. 2008; Fernández-Ruiz et al. 2010).

Particularmente, los ECBs modulan directamente las transmisiones inhibitorias gabaérgicas e excitatorias o glutamatergicas en las vías mesolímbicas, mientras no afecta directamente a la transmisión dopaminérgica (Fernandez-Ruiz, Hernandez & Ramos 2010).

Los ECBs están acompañados por otros congéneres que pese a compartir la estructura endocannabinoide no son activos en los receptores CB1 o CB2. Estos compuestos, de la familia de las aciletanolamidas incluyen a derivados de ácidos grasos saturados y mono- o poli-insaturados (PEA, OEA, 2-LG, etc...), los cuales pueden influir en el su metabolismo y funciones (Schmid & Berdyshev 2002). De hecho la OEA y PEA son agonistas activadores endógenos de receptor para proliferadores de peroxisomas tipo alfa (PPAR $\alpha$ ) (Fu et al. 2003; LoVerme et al. 2005), mientras que 2-LG actúa sobre 2-AG (Ben-Shabat et al. 1998).

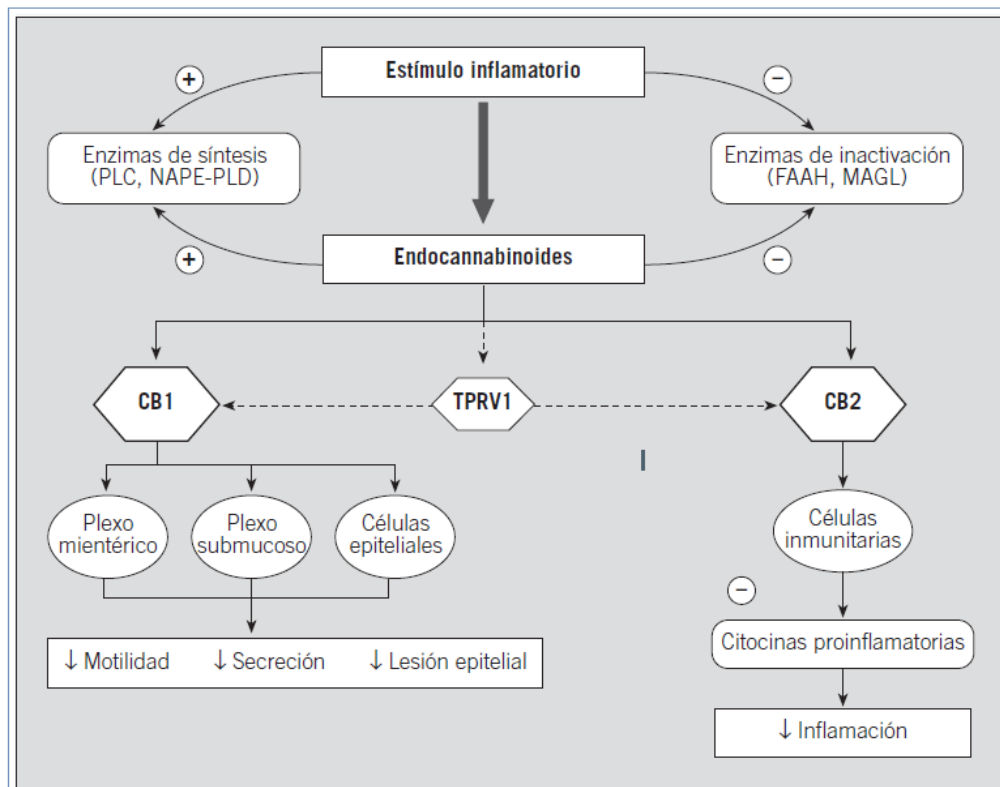


Figura 8. Actividad del sistema endocannabinoide en respuesta a la agresión inflamatoria. El estímulo inflamatorio induce la liberación de ECBs mediante la estimulación de las enzimas de síntesis proteínicas (Lucía Márquez et al. 2008).

Diferentes líneas de investigación sugieren que los ECBs y sus congéneres están involucrados en adquisición y mantenimiento de comportamientos de toma de drogas y procesos relacionados con adicción (Serrano & Parsons 2011; Bilbao et al. 2013). La evidencia científica



apunta a que los efectos adictivos de las drogas están modulados por la alteración de las señales de ECBs, ya que estas moléculas se encuentran alteradas tras la exposición a drogas.

Recientemente, se han relacionado con trastornos psiquiátrico y procesos de adicción. Entre estas moléculas, los derivados de ácidos grasos parecen mostrarse alterados en consumidores de cocaína en abstinencia (Pavon et al. 2013)

Además, lo cambios en concentraciones plasmáticas de ECBs y sus congéneres están relacionados con TUC y comorbilidad psiquiátrica (Pavon et al. 2013). Para este estudio se evaluaron diferentes derivados de ácidos grasos y sus congéneres, en concentraciones plasmáticas: *Las aciletanolamidas*: SEA, PEA, OEA, POEA, AEA\*, LEA, DHEA, DGLEA; y *los acilglicerol*es: 2-AG\*, y 2-LG.

Destacar los perfiles de ambos tipos de ECBs (ej AEA y 2-AG) han sido descritos en diferentes áreas del cerebro tras administración de drogas de abuso (Gonzalez et al. 2002; Caille et al. 2007). Estudios recientes han mostrado también la influencia relevante de las señales de ECBs en la recaída de consumo de drogas para múltiples sustancias, incluida la cocaína, y como la administración de moléculas cannabinoides reinstaura el comportamiento de búsqueda de la sustancia (De Vries et al. 2001; Wiskerke et al. 2008; Serrano & Parsons 2011). Respecto a moléculas no cannabinoides AEs, se ha observado que son capaces de modular la autoadministración de nicotina y la recaída a través de PPAR $\alpha$  (Mascia et al. 2011), por otro lado se ha mostrado en modelo animal, en ratón, recientemente que OEA atenúa los comportamientos inducidos por cocaína relacionados con sensibilización, reforzamiento y búsqueda (Bilbao et al. 2013). En la actualidad, diferentes líneas de investigación se centran en el estudio de la relación entre las concentraciones plasmáticas de ECBs y trastornos crónicos complejos, desde los de tipo inflamatorio o, metabólico hasta los relacionados con trastornos mentales (Monteleone et al. 2005; Jean-Gilles et al. 2009; Koppel et al. 2009; Quercioli et al. 2011; Desfosses et al. 2012). Sin embargo hay poca bibliografía sobre la relación de las concentraciones plasmáticas de ECBs y sus congéneres en sujetos con TUS (Potvin et al. 2008; Desfosses et al. 2012)

### 1.5.3. Mediadores de plasticidad y crecimiento neuronal. Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son péptidos que pueden producirse en neuronas o ser producidos por otras células no neuronales del cerebro. Actúan sobre ciertos receptores acoplados a dominios tirosincinasa. Estos dominios transmiten la señal de los factores neurotróficos hasta el núcleo de estas células, y allí regulan la expresión de los genes mediando el crecimiento neuronal y las características fenotípicas de su entorno.

Estas moléculas se caracterizan por su papel como mediadores en plasticidad y crecimiento neuronal. Además pueden afectar y formar parte de sistemas neurales, inmunes, y endocrino. Parecen tener relación en los efectos de los fármacos para tratamiento de trastornos mentales, y sobretodo un papel importante en las respuestas agudas y crónicas producidas por las drogas adictivas (Castren 2004). Destacando la importancia de dos factores neurotróficos, que se encuentran en plasma y están involucrados como mediadores en plasticidad neuronal,

el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 o somatomedina (IGF-1). En el caso del IGF-1, las proteínas de unión efectoras del mismo (BP-3) no han sido estudiadas en el ámbito de los procesos adictivos.

(1) BDNF es un factor neurotrófico que participa en supervivencia neuronal, diferenciación, sináptogenesis y mantenimiento. La evidencia acumulada sugiere que alteraciones en la expresión de BDNF subyace a gran variedad de trastornos mentales y neurológicos. BDNF ha sido asociado positivamente con algunos trastornos, como depresión mayor y trastorno bipolar, pero hay también hallazgos, aunque no específicos o conflictivos sobre su relación con esquizofrenia y autismo (Domenici & Muglía 2007; Corominas-Rosso et al. 2013). Además, BDNF ha sido evaluado en adictos a cocaína y trastornos comórbidos. De hecho, las concentraciones en suero de BDNF han sido recientemente postuladas como indicador de riesgo de recaída durante las primeras fases de recuperación para dependencia a cocaína en un estudio prospectivo (D'Sa et al. 2011). En otro estudio realizado por Corominas-Roso y sus colegas, mostraron que un incremento en suero de las concentraciones de BDNF durante la abstinencia temprana correlacionaba con *craving* a cocaína y síntomas de abstinencia (Corominas-Roso et al. 2013), pero destaca que este incremento de las concentraciones de BDNF no se observaba en pacientes que presentaban psicosis inducida por cocaína (Corominas-Rosso et al. 2013).

(2) IGF-1 es un mediador trófico regulado por la hormona de crecimiento (GH) que puede encontrarse libre o ligado a proteínas vinculantes en sangre humana. IGFBP-3 es la proteína vinculante más abundante en sangre humana y este complejo prolonga la mitad de la vida de IGF-1. IGF-1 regula proliferación, desarrollo y crecimiento de células neuronales (O'Kusky & Yr 2012; Torres-Aleman 2010). Estos péptidos están también involucrados en la patogénesis y evolución de trastornos psiquiátricos en modelo preclínico (Malberg et al. 2007; Trueba-Saiz et al. 2013) y casos clínicos en individuos adultos ancianos (Lin et al. 2014) y jóvenes (Stouthart et al. 2003). En un estudio transversal en adultos mayores se mostró que la asociación es fuerte entre síntomas depresivos y déficits de memoria en relación a bajos niveles circulantes de IGF-1 (Lin et al. 2014). Adultos jóvenes con deficiencia de GH muestran estados depresivos y ansiosos, pudiendo ser tratados con terapia GH, que incrementa las concentraciones de IGF-1. Además, las concentraciones de IGF-1 correlacionan negativamente con depresión, fatiga, tensión y ansiedad y positivamente con vigor y memoria (Stouthart et al. 2003). Con respecto a las drogas de abuso en humanos, las concentraciones de IGF-1 han sido evaluadas en dependencia al alcohol y opiáceos. Estudios en personas dependientes a alcohol revelan una correlación positiva entre nivel de insulina en sangre y el *craving* a alcohol, pero no entre *craving* a alcohol y concentraciones de IGF-1 durante la fase activa de consumo ni durante la de abstinencia a alcohol (Leggio et al. 2008). En contraste con alcohol, la concentración de IGF-1 en suero se encuentra elevada en dependientes de opioides (Reece 2013). Apenas se ha estudiado sobre los efectos del consumo patológico de cocaína y comorbilidad asociada sobre estas moléculas, siendo de relevante interés dada su funcionalidad en el cerebro y en funciones como la neurogénesis directamente relacionadas con procesos subyacentes a la adicción.

La neurogénesis es un proceso importante en el desarrollo de depresión y funcionamiento de fármacos antidepresivos. Se ha mostrado en modelo animal como el estrés crónico inhibe

neurogénesis (Duman & Monteggia, 2006). Estos procesos están mediados por la actividad de citoquinas y los datos muestran como el estrés induce un decremento de expresión de factores neurotróficos, incluyendo BDNF y por lo tanto neurogénesis (Barrientos et al. 2003; Ben Menachem-Zidon et al. 2008; Koo & Duman, 2008).

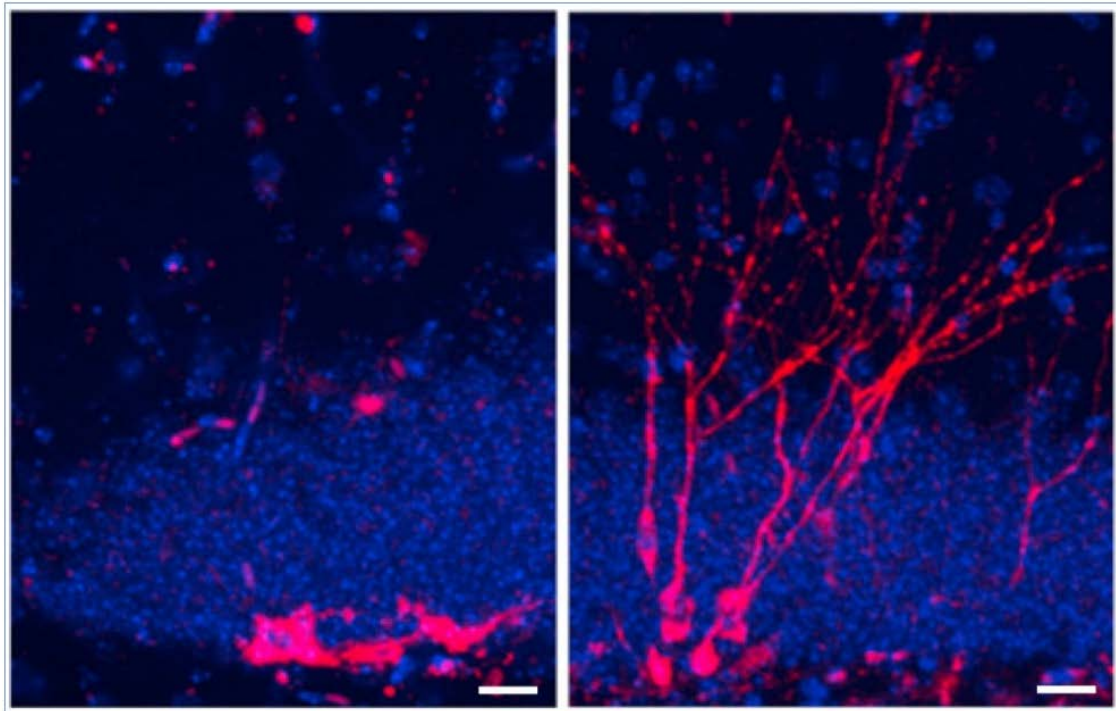


Figura 9. Representación Imagen real comparativa neurogénesis (Seib et al. Cell Stem Cell 2013).



## II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se centra en el estudio de los procesos subyacentes a la adicción con la finalidad de una mejora de los tratamientos existentes a partir de una correcta estratificación y caracterización del sujeto adicto. La adicción es una enfermedad crónica y recidivante que afecta a todos los ámbitos del individuo. Clínicamente, la adicción altera vías metabólicas y de comunicación celular, muy conservadas evolutivamente, como aquellas relacionadas con procesos de recompensa y refuerzo, lo cual modifica la organización del comportamiento del individuo a través de neuroadaptaciones. Todo ello conduce a la pérdida de control sobre el consumo de la sustancia. La investigación en drogodependencias debe estructurarse en torno a 3 pilares:

- La necesidad de integrar la investigación básica con la clínica, para un correcto trasvase de la información entre los modelos experimentales y los pacientes, en especial en lo que atañe a herramientas diagnósticas y terapéuticas.
- La configuración de equipos multidisciplinares capaces de abordar la naturaleza cambiante del fenómeno adictivo, su amplia penetración social y su irrefutable dificultad de abordaje clínico y social.
- La necesidad de apostar por las nuevas tecnologías que permitan integrar las informaciones procedentes de los múltiples sectores involucrados, imitando lo que tan buenos resultados está dando en otras patologías prevalentes como la enfermedad cardiovascular y la diabetes. (Rodríguez de Fonseca, Los nuevos desafíos de la ciencia 2011).

### 2.1. HIPOTESIS

Este trabajo parte de la premisa de que ciertas moléculas circulantes que intervienen en procesos cerebrales relacionados con comunicación y migración celular podrían aparecer alteradas en sujetos en relación a su historial de adicción o consumo patológico de cocaína y la comorbilidad psiquiátrica asociada. Puesto que existen antecedentes de alteraciones en algunas de estas moléculas en adicción y trastornos psiquiátricos, algunas de ellas podrían identificarse como potenciales marcadores biológicos de fenómenos asociados a la adicción a cocaína (gravedad de la adicción, duración de la abstinencia, tiempo de consumo problemático, etc.) y/o comorbilidad psiquiátrica.

Centrándonos en los 3 estudios llevados a cabo:

#### 2.1.1 Hipótesis. Estudio I.

La adicción a drogas de abuso y los procesos psicopatológicos afectan al sistema inmunitario y altera los niveles circulantes de citoquinas y quemoquinas. Las señales inflamatorias y sus receptores se expresan también en el cerebro y se relacionan con migración celular, comunicación neuronal y modulación sináptica. Por lo tanto, es posible que estas alteraciones en sus niveles plasmáticos puedan ser responsables de las respuestas patológicas centrales

como la propia adicción y el desarrollo de trastornos psiquiátricos comórbidos al uso de droga. Pero también es posible que estos cambios sean sólo un reflejo especular de lo que ocurre a nivel central:

**H1.** Alteraciones de señales inflamatorias por consumo de cocaína permiten poder proponerlas como biomarcadores de consumo.

**H2.** Alteraciones de señales inflamatorias por consumo de cocaína pueden asociarse al número de síntomas de abuso y dependencia a cocaína, y por tanto pueden proponerse como biomarcadores de gravedad.

**H3.** El consumo crónico de cocaína presenta una elevada comorbilidad psicopatológica. Por tanto, biomarcadores inflamatorios de consumo o de gravedad de adicción a cocaína podrían actuar también como predictores de trastornos psiquiátricos comórbidos.

### **2.1.2. Hipótesis .Estudio II**

Un uso patológico de cocaína podría inducir cambios en los niveles plasmáticos de factores de crecimiento como BDNF e IGF-1. Puesto que ambos factores tróficos se han visto alterados tanto en trastornos psiquiátricos como en un contexto de adicción, y además tienen un papel crucial en el SNC en fenómenos de neuroplasticidad, alteraciones en sus niveles plasmáticos podrían ser responsables de las respuestas patológicas centrales como la propia adicción y el desarrollo de trastornos psiquiátricos comórbidos al uso de cocaína. Pero también es posible que estos cambios sean sólo un reflejo especular de lo que ocurre a nivel central:

**H1.** Alteraciones de BDNF e IGF-1 por consumo de cocaína permiten poder proponerlas como biomarcadores de consumo.

**H2.** Alteraciones de BDNF e IGF-1 por consumo de cocaína pueden asociarse al número de síntomas de abuso y dependencia a cocaína, y por tanto pueden proponerse como biomarcadores de gravedad.

**H3.** El consumo crónico de cocaína presenta una elevada comorbilidad psicopatológica. Por tanto, estos factores podrían actuar también como predictores de trastornos psiquiátricos comórbidos.

**H4.** Alteraciones de BDNF e IGF-1 por el consumo crónico de cocaína podrían producir cambios en las correlaciones existentes con otras moléculas circulantes relacionadas con adicción y trastornos psiquiátricos, tales como los derivados de ácidos grasos aciletanolamidas y acilglicerol.

### **2.1.3. Hipótesis. Estudio III.**

Previos estudios han mostrado diferencias sexuales en todas las fases relacionadas con la progresión a la adicción a cocaína (uso, abuso y dependencia) y efectos de las hormonas

sexuales sobre sistemas de señalización centrales relacionadas con estrés y recompensa. Por tanto, el sexo es un factor determinante que podría influir sobre potenciales biomarcadores de adicción a cocaína y comorbilidad psiquiátrica:

**H1.** Alteraciones de las concentraciones plasmáticas de quemoquinas y citoquinas por consumo de cocaína podrían verse afectadas por diferencias sexuales.

**H2.** Alteraciones de las concentraciones plasmáticas de derivados de ácidos grasos (aciletanolamidas y acilglicerol) por consumo de cocaína podrían verse afectadas por diferencias sexuales.

**H3.** El factor sexo debería tenerse en cuenta en la búsqueda e identificación de biomarcadores de consumo y gravedad de adicción a cocaína.

**H4.** El factor sexo debería tenerse en cuenta en el estudio de la adicción a cocaína y la comorbilidad psiquiátrica asociada para la mejora de tratamientos.

## **2.2. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo de tesis es el estudio de los procesos subyacentes a la adicción a cocaína, a través de la identificación y caracterización de moléculas plasmáticas circulantes como posibles marcadores biológicos de uso patológico o adicción a cocaína (duración de abstinencia, tiempo de uso problemático, gravedad de la adicción, etc.) y/o comorbilidad psiquiátrica. Los diferentes estudios se realizarán en una cohorte de usuarios a cocaína en abstinencia en tratamiento ambulatorio.

### **2.2.1. Objetivos. Estudio I**

Identificar y caracterizar citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) y quemoquinas (CX3CL1, CCL2 y CXCL12) en plasma como posibles biomarcadores de uso patológico de cocaína y/o comorbilidad psiquiátrica.

**01.** Reclutamiento de consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio en abstinencia y controles que cumplan los criterios de participación en el estudio.

**02.** Evaluación psiquiátrica de todos los participantes mediante entrevistas especializadas de evaluación clínica para población drogodependiente y fenotipación de cada sujeto.

**03.** Determinación de las concentraciones de citoquinas y quemoquinas en plasma de pacientes y controles.

**04.** Analizar los datos con diferentes aproximaciones estadísticas para identificar posibles biomarcadores

**O5.** Determinación de las concentraciones de citoquinas y quemoquinas candidatas a biomarcadores en plasma de modelos animales tratados con cocaína.

### **2.2.2. Objetivos. Estudio II**

Identificar y caracterizar factores de crecimiento (BDNF, IGF-1) y proteínas de unión relacionadas (IGFBP-3) en plasma como posibles biomarcadores de abuso y dependencia a cocaína y/o comorbilidad psiquiátrica.

- O1.** Reclutamiento de consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio en abstinencia y controles que cumplan los criterios de participación en el estudio.
- O2.** Evaluación psiquiátrica de todos los participantes mediante entrevistas personales.
- O3.** Determinación de las concentraciones de BDNF, IGF-1 e IGFBP-3 en plasma.
- O4.** Analizar los datos con diferentes aproximaciones estadísticas para identificar posibles biomarcadores así como su asociación con biomarcadores previamente identificados.

### **2.2.3. Objetivos. Estudio III**

Estudiar el efecto de las diferencias sexuales sobre las concentraciones plasmáticas de potenciales marcadores biológicos de adicción y/o comorbilidad psiquiátrica: Aciletanolamidas (SEA, PEA, OEA, POEA, AEA, LEA), acilgliceroles (2-AG, 2-LG), citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-10) y quemoquinas (CX3CL1, CCL2, CXCL12).

- O1.** Reclutamiento de consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio en abstinencia y controles que cumplan los criterios de participación en el estudio con una especial atención para el reclutamiento de mujeres.
- O2.** Evaluación psiquiátrica de todos los participantes mediante entrevistas personales.
- O3.** Determinación de las concentraciones de derivados de ácidos grasos y señales inflamatorias en plasma atendiendo al sexo.
- O4.** Analizar los datos con diferentes aproximaciones estadísticas para identificar efectos por sexo, edad y otras variables que pudieran influir sobre las concentraciones de estas moléculas circulantes.



### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 Diseño general

Esta tesis se enmarca dentro de un extenso y completo trabajo exploratorio y transversal de una población de consumidores de cocaína en abstinencia que se hallaban en tratamiento ambulatorio (grupo cocaína). La exploración y caracterización de esta población adicta a cocaína se llevó a cabo mediante su comparación con una población de sujetos sanos (grupo control). Todos los estudios generados a partir de estas poblaciones, y recogidos en el presente trabajo de tesis, se realizaron a partir de entrevistas psiquiátricas y la determinación plasmática de potenciales marcadores biológicos relacionados con el uso de cocaína y comorbilidad psiquiátrica. Complementariamente, se realizó un estudio con un modelo animal para determinar niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios tras la administración de cocaína.

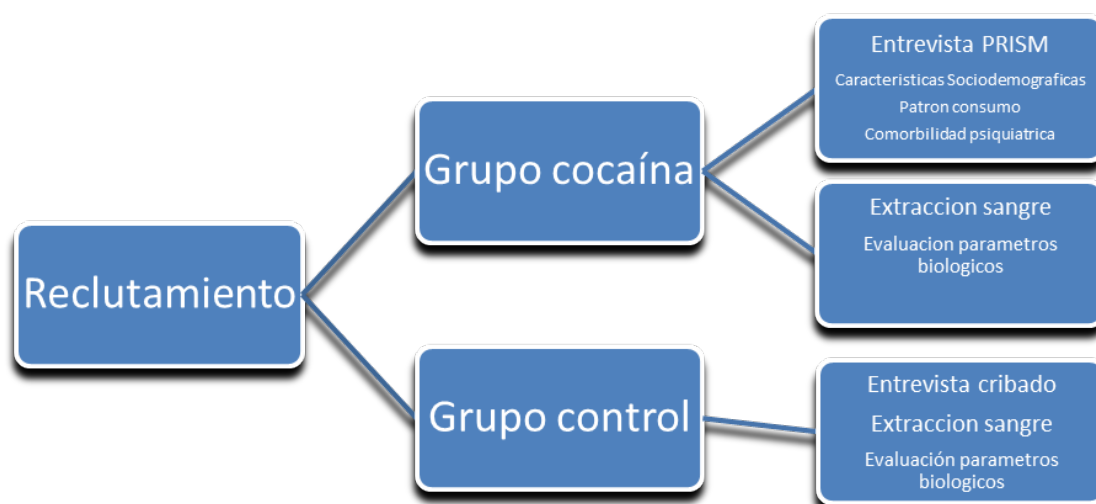


Figura 9. Procedimiento integral de evaluación psicopatológica y de extracción de sangre periférica.

#### 3.2. Población

La población participante en este trabajo estaba formada por sujetos de ambos sexos, de raza blanca caucásica, distribuidos en dos grupos en función de la existencia de un historial por consumo de cocaína: 1) Un grupo de pacientes abstinentes a cocaína procedentes de centros provinciales de drogodependencias (CPD) de Málaga con un historial de consumo de cocaína exclusivamente por vía nasal; 2) Un grupo control de individuos sin historial de consumo de sustancias que fue seleccionado de un modo equivalente a la edad, índice de masa corporal (IMC) y ratio de sexo del grupo cocaína.

### 3.2.1. Criterios de participación

El reclutamiento de la población para los diferentes estudios se basó en el cumplimiento de una serie de criterios de participación:

#### (A) Criterios de inclusión

- (1) Todos los sujetos eran mayores de edad, con una edad comprendida entre 18 a 65 años.
- (2) Los consumidores de cocaína debían haber sido diagnosticados por uso patológico de cocaína (*binge* y/o intoxicación) o bien por un trastorno por uso de cocaína (abuso y/o dependencia de cocaína, TUC). El diagnóstico del uso patológico de cocaína y TUC fue determinado mediante una entrevista personal con cada paciente con una duración entre 2 y 4 horas.
- (3) Los consumidores de cocaína debían estar en abstinencia como mínimo dos semanas previas a la analítica. El control de abstinencia se realizó mediante entrevistas personales y resultados de análisis semanales de orina en los CPDs para la detección de uso de cocaína, anfetamina, opiáceos, barbitúricos y cannabis. Para estas analíticas se empleó un sistema de detección de drogas *V-Twin Drug Testing System* (Siemens AG, Earlangen, Alemania). Posteriormente, se realizarían analíticas en plasma para verificar la abstinencia a cocaína.

#### (B) Criterios de exclusión

- (1) Los participantes no debían tener historial de enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, respiratorias, renales, hepáticas, neurológicas o endocrinas, así como historial de cáncer.
- (2) Los participantes no debían padecer enfermedades infecciosas. Este criterio se comprobó a través de pruebas de rápida detección en plasma para VIH, hepatitis B y C. En caso de resultados positivos, las muestras de sangre se eliminaron siguiendo un protocolo de seguridad de laboratorio para minimizar los riesgos de infección del personal sanitario.
- (3) Dada la necesidad de seguir las directrices del entrevistador, los participantes no debían presentar alteraciones cognitivas incapacitantes o esquizofrenia severa. Este criterio se valoró durante la realización de la entrevista.
- (4) En el caso de participantes mujeres, se excluirían mujeres embarazadas para evitar la alteración de parámetros biológicos.
- (5) Los sujetos controles no debían presentar historial de trastornos por uso de sustancias (TUS).

Existen algunas diferencias entre los diferentes estudios respecto a los criterios de inclusión y exclusión, que se especificarán en cada caso. Durante el reclutamiento, se realizó un esfuerzo

adicional para conseguir un número representativo de mujeres con problemas por uso de cocaína.

### 3.2.2. Descripción población por estudios

Se emplearon los criterios generales de participación anteriormente descritos, y de forma específica se añadieron criterios de inclusión o exclusión para cada estudio concreto.

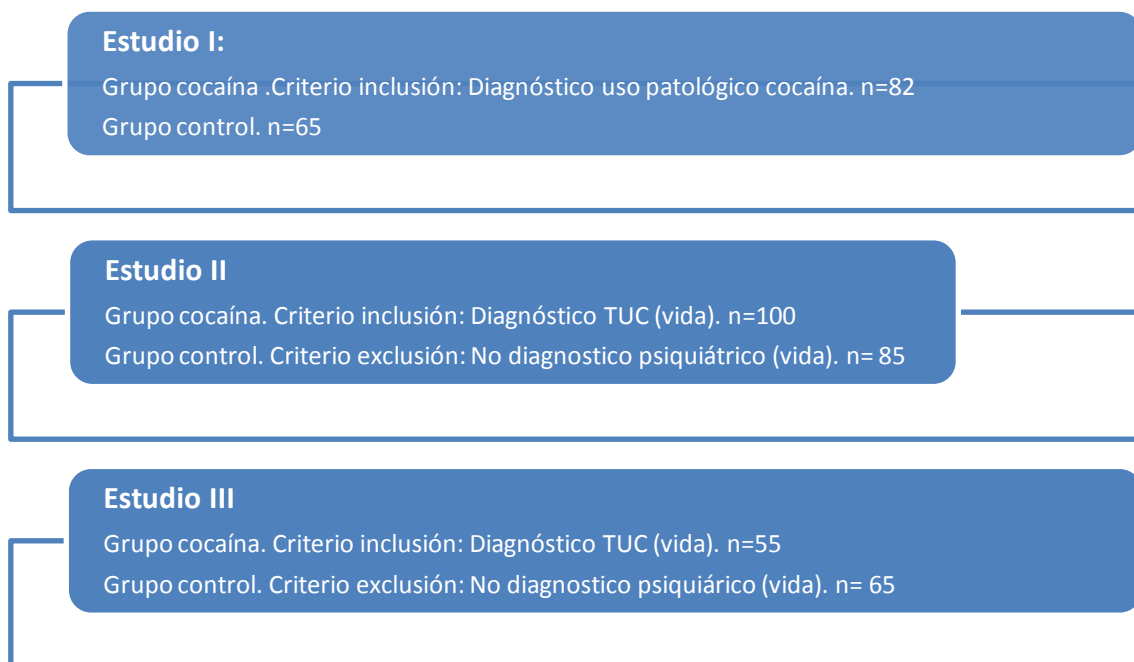


Figura 10. Descripción de la población y los criterios específicos para cada estudio.

### 3.3. Aspectos éticos

Todos los sujetos fueron informados mediante una descripción completa e individual de los estudios antes de la realización de la extracción de sangre y la entrevista personal, obteniéndose el consentimiento informado de cada sujeto que decidió participar. Los estudios y protocolos para reclutamiento fueron aprobados por el comité ético del Hospital Regional Universitario de Málaga de acuerdo a los principios éticos de investigación en humanos aprobados en la Declaración de Helsinki por la asociación médica mundial (séptima revisión en 2013, Fortaleza, Brasil).

### 3.4. Evaluación clínica

Se realizó una evaluación y fenotipación minuciosa de cada sujeto de estudio mediante una entrevista psicopatológica, realizada por profesionales experimentados y especializados en los instrumentos. Se realizó el mismo procedimiento para el grupo control, pero la entrevista se llevó a cabo en un formato de cribado diagnóstico.

#### 3.4.1. Entrevista PRISM

Todos los sujetos fueron evaluados de acuerdo a criterios del manual diagnóstico DSM-IV-TR, mediante la versión española de la “entrevista de investigación psiquiátrica para trastornos por uso de sustancias y trastornos mentales” (*Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases*, PRISM) (Hasin et al. 1996; Torrens et al. 2004). El instrumento PRISM, es una entrevista semiestructurada, con demostradas cualidades psicométricas en términos de fiabilidad test-retest (Hasin et al. 2006), fiabilidad entre diferentes evaluadores (Morguello et al. 2006) y validez (Torrens et al. 2004) para el diagnóstico de trastornos psiquiátricos en usuarios consumidores de sustancias de abuso. Es una entrevista extensa y que abarca la problemática desde diferentes enfoques, valorando la interacción entre el patrón de consumo y la comorbilidad psiquiátrica. En primer lugar, recoge datos sociodemográficos, patrón de consumo de las diferentes sustancias de abuso según criterios DSM-IV TR y por último trastornos psiquiátricos comórbidos y su relación con la sustancia de consumo.

Este instrumento permite diagnosticar la prevalencia de consumo y de comorbilidad psiquiátrica a lo largo de la vida, diferenciando temporalmente entre diagnóstico “presente” (últimos 12 meses) y “pasado” (previo a los últimos 12 meses), así como el diagnóstico de trastornos primarios o inducidos por sustancias, en relación a la temporalidad y afectación del consumo de la sustancia.

Además del diagnóstico del abuso y dependencia a sustancias, la PRISM diferencia el uso patológico del uso ocasional.

#### (A) Uso patológico

La evaluación del patrón de uso patológico de la sustancia de abuso, se define como consumo de la sustancia cuatro veces en una semana durante un mes, (patrón de consumo en intoxicación crónica) o consumo de la sustancia la mayor parte del día durante tres días seguidos, como por ejemplo un fin de semana empleado en actividades relacionadas con el consumo de la sustancia, buscando, consumiendo y encontrándose mal por los efectos de la misma (consumo en *binge* o atracón).

#### (B) Abuso y dependencia

El diagnóstico de TUS viene determinado por la suma de criterios de abuso (4 criterios) y dependencia (7 criterios totales) según diagnóstico DSM-IV-TR. Así pues, el diagnóstico de abuso se basa en el cumplimiento de al menos 1 criterio de abuso, mientras que para

el diagnóstico de dependencia se precisa de al menos 3 criterios de dependencia. Para diagnóstico de TUS debe cumplir 1 criterio de abuso y/o 3 criterios de dependencia.

### **3.4.2. Gravedad de la adicción a cocaína**

La gravedad de síntomas por uso de cocaína se obtuvo combinando los criterios DSM-IV TR para el diagnóstico de abuso y dependencia a cocaína: 7 criterios de dependencia y 4 criterios de abuso. Esta evaluación de la gravedad coincide con la unidimensionalidad propuesta por los nuevos criterios de DSM-5 (Hasin et al. 2013; Pavon et al. 2013).

## **3.5. Determinación de parámetros bioquímicos**

Muestras de sangre fueron recogidas en horario de mañana (09:00-12:00 h), previamente a la entrevistas psiquiátricas con PRISM. A partir del plasma de estas muestras se determinaron diferentes moléculas circulantes.

### **3.5.1. Obtención y procesamiento de la sangre**

La sangre periférica fue extraída y transportada en tubos de 10 ml con K2 EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras de sangre fueron inmediatamente procesadas para la obtención del plasma a través de su centrifugación a 2200 xg durante 15 minutos (4°C).

(1) Una vez obtenido el plasma de la fase sobrenadante, se realizaron análisis de forma individual para la detección de enfermedades infecciosas mediante test rápidos de detección para VIH (Retroscreen HIV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd., Goa, India), hepatitis B (HBsAg test, Toyo Diagnostics-Turkclab Inc., Izmir, Turquía) y hepatitis C (Flaviscreeen HCV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd.). Las muestras que resultaron positivas a alguna enfermedad infecciosa se eliminaron siguiendo los protocolos de seguridad.

(2) Además, se realizaron análisis plasmáticos complementarios para confirmar la abstinencia a cocaína de al menos 2 semanas mediante la detección de metabolitos de cocaína (Benzoylecgonine Specific Direct ELISA Kit Immunalysis, Pomona, CA, EE.UU.).

Las muestras plasmáticas válidas fueron alicuotadas en varios criotubos perfectamente codificados y se almacenaron a -80°C hasta sus posteriores análisis.

Un tubo de sangre individual se envió al Biobanco de la Red de Trastornos Adictivos una vez confirmada la ausencia de enfermedades infecciosas y el estado de abstinencia del participante.

### 3.5.2. Cuantificación de mediadores inflamatorios

Se realizó la cuantificación de la concentración de citoquinas y quemoquinas a partir de las muestras plasmáticas de sujetos control y cocaína almacenadas a -80°C.

Las citoquinas y quemoquinas evaluadas en estos estudios fueron seleccionadas a partir de estudios previos sobre mediadores inflamatorios y trastornos psiquiátricos comórbidos relacionados con adicción, en los cuales se mostraba la presencia de estas señales (o sus receptores) en neuronas o células glía en circuitos relevantes para la adicción o relacionadas con trastornos mentales.

Para cuantificar las concentraciones plasmáticas de estas señales inflamatorias, se usó un sistema complejo de análisis *Bio-Plex Suspension Array System 200* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), un kit de inmunoensayo de Procarta con microesferas de poliestireno y un kit de dilución estándar (Affymetrix-Panomics, Santa Clara, CA, EE.UU.). Este método de análisis se basa en la tecnología *Luminex* y el empleo de paneles multiplex para la determinación simultánea de varios analitos.

Los paneles fueron creados para evaluar hasta 7 citoquinas y quemoquinas de humanos:

#### (A) Citoquinas proinflamatorias

- Factor de necrosis tumoral alfa [*Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ )]
- Interleuquina 1 beta [*Interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ )]

#### (B) Citoquina antiinflamatoria

- Interleuquina 10 [*Interleukin-10* (IL-10)]

#### (C) Citoquina mixto pro – anti inflamatoria

- Interleuquina 6 [*Interleukin-6* (IL-6)]

#### (D) Quemoquinas

- CCL2 [*Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1)]
- CXCL12 [*Stromal Cell-Derived Factor* (SDF-1)]
- CX3CL1 (Fractalquina, *fractalkine*)

Las medidas de estos mediadores en plasma se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Brevemente (procedimiento para una placa de 96 pocillos):

Después de preparar tampón de lavado 1x a partir de 10x con agua bidestilada, la placa de 96 pocillos se incubó con 150  $\mu$ l de tampón de lectura durante 5 minutos a temperatura ambiente. Cincuenta  $\mu$ l de solución con esferas conjugadas con anticuerpos fueron añadidos a cada pocillo de la placa. Tras añadir tampón de lavado 1x,

se añadió a cada pocillo 25 µl de tampón específico de plasma y 25 µl de estándares (rango =0,62 pg/ml a 40600 pg/ml) ó 25 µl de muestras (con dos replicas). A continuación, la placa fue incubada en agitación durante una hora a temperatura ambiente y la solución fue eliminada por aspiración en vacío. Después, la placa se lavó y se añadieron 25 µl de anticuerpo de detección multiplex, agitando la placa durante otros 30 minutos. Tras un nuevo lavado, se añadió a cada pocillo 50µl de solución estreptavidina R-ficoeritrina durante 30 minutos, seguido de un nuevo lavado y la adición de 120 µl de tampón de lectura. Una última incubación durante 30 minutos se realizó antes de la cuantificación por el *luminex*.

Los datos (intensidad media de fluorescencia) se analizaron utilizando el programa *Bio-Plex Manager Software 4.1*. (Bio-Rad Laboratories). Los datos fueron expresados como picogramos (pg) de proteína/ml de plasma.

Excepcionalmente, se evaluaron IL-1β, CX3CL1/fractalquina y CXCL12/SDF-1 en el plasma de ratones sometidos a tratamientos agudos y crónicos con cocaína (sacrificados a 0, 30, 60, 120 y 240 minutos). En este caso las cuantificaciones se realizaron con ELISAS individuales [*Mouse CX3CL1/fractalkine Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), *Mouse CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems) y *Mouse IL-1β Platinum ELISA* (Affymetrix-eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.).

Ratones macho de la cepa OF1 (Oncins France 1) (Charles River Laboratories, Barcelona, España) fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 25 mg/kg de hidrocloreto de cocaína (Laboratorios Alcaliber, Madrid, España) en un volumen de 0.01 ml/g disuelto en suero salino (NaCl 0.9%). La dosis de elección se basó en estudios previos (Rodríguez-Arias et al.2009).

### 3.5.3. Cuantificación de factores de crecimiento y proteínas relacionadas

Los siguientes factores tróficos y proteína de unión fueron determinadas en plasma a partir de las muestras de sujetos control y cocaína almacenadas a -80°C:

- Factor neurotrófico derivado del cerebro [*Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF)]
- Factor de crecimiento insulínico tipo 1 [*Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1)]
- Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico tipo 3 [*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3* (IGFBP-3)]

La cuantificación de BDNF se llevó a cabo un análisis por inmunoensayo multiplex, similar al descrito anteriormente con las señales inflamatorias.

Sin embargo, la cuantificación de IGF1 y IGFBP-3 se llevó a cabo mediante un análisis por radioinmunoensayo (RIA).

Las concentraciones totales de IGF-1 fueron estimadas por RIA con doble anticuerpo, después de la retirada de IGFBPs del suero mediante extracción con etanol ácido. Para confirmar la ausencia de IGFBPs, fracciones plasmáticas con y sin extracciones fueron incubadas con IGF-1- $I^{125}$  a 4°C durante 24 horas. Se empleó carbono activo para separar los marcadores (IGF-1- $I^{125}$ ) unidos y libres. El antisuero IGF-1 (UB2-495) fue proporcionado por los Drs. Underwood y Van Wisk, a través del programa *Hormone Distribution* del instituto *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK). Las concentraciones de IGF-1 fueron expresadas en términos de IGF-1 de rata (Gropep Bioreagents Pty Ltd, Adelaida, SA, Australia). La sensibilidad del test fue 10 ng/mL y el coeficiente de variación inter-ensayo fue 8%. Todas las muestras fueron evaluadas en el mismo momento.

Las concentraciones plasmáticas de IGFBP-3 fueron determinadas en duplicado por RIA usando el kit disponible (Mediagnost GmbH, Reutlingen, Alemania) siguiendo el protocolo indicado. La sensibilidad del ensayo fue 500 pg/mL y del coeficiente de variación intra-ensayo fue 7,5%.



Figura 11. Procesamiento de muestras biológicas en laboratorio.

#### 3.5.4. Cuantificación de derivados de ácidos grasos en plasma

Por último, se determinaron las concentraciones plasmáticas de las siguientes aciletanolamidas y acilgliceroles (algunos de ellos endocannabinoides):

##### (A) Aciletanolamidas

- N-estearil-etanolamina [*N-stearoyl-ethanolamine* (SEA)]
- N-palmitil-etanolamina [*N-palmitoyl-ethanolamine* (PEA)]
- N-oleil-etanolamina [*N-oleoyl-ethanolamine* (OEA)]
- N-palmitoleil-etanolamina [*N-palmitoleoyl-ethanolamine* (POEA)]
- N-araquidonil-etanolamina [*N-arachidonoyl-ethanolamine* (AEA)]



- N-linoleil-etanolamina [*N-linoleoyl-ethanolamine* (LEA)]
- N-dihomo-gamma-linolenil-etanolamina [*N-dihomo-γ-linolenoyl-ethanolamine* (DGLEA)]
- N-docosahexaenil-etanolamina [*N-docosahexaenoyl-ethanolamine* (DHEA)]

#### (B) Acilglicerol

- 2-araquidonil-glicerol [*2-arachidonoyl-glycerol* (2-AG)]
- 2-linoleil-glicerol [*2-linoleoyl-glycerol* (2-LG)]

Se emplearon formas deuteradas de estos derivados lipídicos como marcadores para la cuantificación: PEA-d4, OEA-d4, AEA-d4, LEA-d4, DHEA-d4, 2-AG-d5.

La extracción y la separación de todas estas moléculas se realizó mediante un sistema de espectrometría de masa en tándem (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) como se mostró en estudios previos (Pavon et al. 2013). La composición de la fase móvil fue: A) 0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua; B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo.

El espectrómetro de masas empleado operó con una electropulverización positiva. La monitorización de reacción múltiple fue empleada para los análisis con los siguientes precursores para producir transiciones iónicas: m/z 328,1/62 para SEA, m/z 300,1/62 para PEA, m/z 304,4/66 para PEA-d4, m/z 326,1/62 para OEA, m/z 330,4/66 para OEA-d4, m/z 298,2/62 para POEA, m/z 348,3/62 para AEA, m/z 352,2/66 para AEA-d4, m/z 324,5/62 para LEA, m/z 328,5/66 para LEA-d4, m/z 372,6/62 para DHEA, m/z 376,3/66 para DHEA-d4, m/z 350,2/62 para DGLEA, m/z 379,2/287 para 2-AG, m/z 384,3/287 para 2-AG-d5 y m/z 355,2/263 para 2-LG.

Se utilizó una curva externa de calibración de seis puntos en la fase móvil (10:90, A:B) y fue empleado un incremento de presión con 0,4-25 ng de aciletanolamidas y 0,8—0 ng para 2-acilglicerol para la cuantificación (Rivera et al. 2013). Los resultados de concentraciones plasmáticas se expresaron en ng/ml.

### 3.6. Estadística

Todos los datos representados en gráficos y tablas fueron expresados en número y porcentajes de sujetos [n (%)], medias y desviación estándar de las concentraciones [media (SD)] o valores individuales de variables (correlaciones). Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas de ordenador Graph-Pad Prism versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) e IBM SPSS Statistical versión 22 (IBM, Armonk, NY, EE.UU.).

### 3.6.1. Análisis de distribución

Las prevalencias [n (%)] obtenidas con tablas de contingencia para diferentes grupos o categorías fueron evaluadas estadísticamente mediante el “test exacto de Fisher” o “prueba de Chi-cuadrado” empleando el número de sujetos.

### 3.6.2. Análisis de medias

Respecto a las variables discretas y continuas, su distribución fue previamente evaluada utilizando la prueba de normalidad “D’Agostino & Pearson” para poder aplicar estadística paramétrica o no paramétrica. De este modo, para comparar dos grupos se aplicaron las pruebas “t de Student” (distribución normal) y “U de Mann-Whitney” (distribución no normal), mientras que para la comparación de tres grupos o más se empleó un análisis de varianza (ANOVA) (distribución normal) o una prueba ANOVA de rangos de “Kruskal-Wallis” (distribución no normal). Comparaciones múltiples pareadas se realizarán *a posteriori* tras ANOVA o Kruskal-Wallis.

### 3.6.3. Análisis de correlaciones

Los análisis de correlación fueron realizados empleando el “coeficiente de correlación de Pearson” (r) para variables continuas con distribución normal, y el “coeficiente de Spearman” (rho) para distribuciones no normales y variables discretas.

### 3.6.4. Análisis de regresión logística y curvas ROC

Para determinar variables explicativas o predictoras de un evento (por ejemplo, diagnóstico de TUC o gravedad de adicción) se partió del análisis de concentraciones mediante un modelo de regresión logística binaria basado en probabilidades. La calibración del modelo logístico se valoró mediante el “test Hosmer-Lemeshow”. Se valoró el poder discriminativo del modelo logístico obtenido mediante el análisis “*receiver operating characteristics*” (ROC), considerando el área de la curva (AUC) permitiéndonos saber la sensibilidad y especificidad del modelo.

# Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity

Pedro Araoz<sup>1\*</sup>, María Pedraz<sup>1\*</sup>, Antonia Serrano<sup>1\*</sup>, Miguel Lucena<sup>1</sup>, Vicente Barrios<sup>2</sup>, Nuria García-Marchena<sup>1</sup>, Rafael Campos-Cloute<sup>3</sup>, Juan J. Ruiz<sup>4</sup>, Pablo Romero<sup>1</sup>, Juan Suárez<sup>1</sup>, Elena Baixeras<sup>1</sup>, Rafael de la Torre<sup>5,6</sup>, Jorge Montesinos<sup>7</sup>, Consuelo Guerri<sup>7</sup>, Marta Rodríguez-Arias<sup>8</sup>, José Miñarro<sup>8</sup>, Roser Martínez-Riera<sup>5,9,10</sup>, Marta Torrens<sup>5,9,10</sup>, Julie A. Chowen<sup>2</sup>, Jesús Argente<sup>2</sup>, Barbara J. Mason<sup>11</sup>, Francisco J. Pavón<sup>1</sup> & Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1</sup>

Unidad Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain<sup>1</sup>, Department of Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain<sup>2</sup>, Centro Comarcal de Drogodependencias, Mijas, Spain<sup>3</sup>, Centro de Tratamiento Ambulatorio, Málaga, Spain<sup>4</sup>, Neurosciences Program, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IHIM), Barcelona, Spain<sup>5</sup>, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Barcelona, Spain<sup>6</sup>, Department of Cellular Pathology, Príncipe Felipe Research Centre, Valencia, Spain<sup>7</sup>, Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Valencia, Spain<sup>8</sup>, Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) del Parc de Salut MAR, Barcelona, Spain<sup>9</sup>, Department of Psychiatry, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain<sup>10</sup> and Committee on the Neurobiology of Addictive Disorders, The Scripps Research Institute (TSRI), La Jolla, CA, USA<sup>11</sup>

## ABSTRACT

The treatment for cocaine use constitutes a clinical challenge because of the lack of appropriate therapies and the high rate of relapse. Recent evidence indicates that the immune system might be involved in the pathogenesis of cocaine addiction and its co-morbid psychiatric disorders. This work examined the plasma pro-inflammatory cytokine and chemokine profile in abstinent cocaine users ( $n = 82$ ) who sought outpatient cocaine treatment and age/sex/body mass-matched controls ( $n = 65$ ). Participants were assessed with the diagnostic interview Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR). Tumor necrosis factor- $\alpha$ , chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12)/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) were decreased in cocaine users, although all cytokines were identified as predictors of a lifetime pathological use of cocaine. Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), chemokine (C-X<sub>3</sub>-C motif) ligand 1 (CX3CL1)/fractalkine and CXCL12/SDF-1 positively correlated with the cocaine symptom severity when using the DSM-IV-TR criteria for cocaine abuse/dependence. These cytokines allowed the categorization of the outpatients into subgroups according to severity, identifying a subgroup of severe cocaine users (9–11 criteria) with increased prevalence of co-morbid psychiatric disorders [mood (54%), anxiety (32%), psychotic (30%) and personality (60%) disorders]. IL-1 $\beta$  was observed to be increased in users with such psychiatric disorders relative to those users with no diagnosis. In addition to these clinical data, studies in mice demonstrated that plasma IL-1 $\beta$ , CX3CL1 and CXCL12 were also affected after acute and chronic cocaine administration, providing a preclinical model for further research. In conclusion, cocaine exposure modifies the circulating levels of pro-inflammatory mediators. Plasma cytokine/chemokine monitoring could improve the stratification of cocaine consumers seeking treatment and thus facilitate the application of appropriate interventions, including management of heightened risk of psychiatric co-morbidity. Further research is necessary to elucidate the role of the immune system in the etiology of cocaine addiction.

**Keywords** Binge, chronic intoxication, cocaine, mice, PRISM, psychiatric co-morbidity, substance use disorders.

Correspondence to: Francisco J. Pavón; Fernando Rodríguez de Fonseca, Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital R. U. de Málaga 82, sótano. Málaga 29010, Spain. E-mail: javier.pavon@ibima.eu; fernando.rodriguez@ibima.eu

\*These authors contributed equally to the present study.

RESEARCH ARTICLE

# Plasma Concentrations of BDNF and IGF-1 in Abstinent Cocaine Users with High Prevalence of Substance Use Disorders: Relationship to Psychiatric Comorbidity

María Pedraz<sup>1</sup>✉, Ana Isabel Martín-Velasco<sup>2</sup>✉, Nuria García-Marchena<sup>1</sup>✉, Pedro Araos<sup>1</sup>, Antonia Serrano<sup>1</sup>, Pablo Romero-Sanchiz<sup>1</sup>, Juan Suárez<sup>1</sup>, Estela Castilla-Ortega<sup>1</sup>, Vicente Barrios<sup>3,4,5</sup>, Rafael Campos-Cloute<sup>6</sup>, Juan Jesús Ruiz<sup>7</sup>, Marta Torrens<sup>8,9,10</sup>, Julie Ann Chowen<sup>3,4,5</sup>, Jesús Argente<sup>3,4,5</sup>, Rafael de la Torre<sup>5,8,11</sup>, Luis Javier Santín<sup>12</sup>, María Ángeles Villanúa<sup>2</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,5\*</sup>, Francisco Javier Pavón<sup>1\*</sup>



## OPEN ACCESS

**Citation:** Pedraz M, Martín-Velasco AI, García-Marchena N, Araos P, Serrano A, Romero-Sanchiz P, et al. (2015) Plasma Concentrations of BDNF and IGF-1 in Abstinent Cocaine Users with High Prevalence of Substance Use Disorders: Relationship to Psychiatric Comorbidity. PLoS ONE 10(3): e0118610. doi:10.1371/journal.pone.0118610

**Academic Editor:** Robert N. Pechnick, Case Western Reserve University School of Dental Medicine, UNITED STATES

**Received:** October 3, 2014

**Accepted:** January 19, 2015

**Published:** March 3, 2015

**Copyright:** © 2015 Pedraz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The present study has been supported by Instituto de Salud Carlos III (ISC-III), Red de Trastornos Adictivos UE-FEDER 2012 (RD12/0028); Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/02261); Plan Nacional sobre Drogas 049/2009 and 049/2013; Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía UE-FEDER (CTS-433); Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta

1 Unidad Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga-Universidad de Málaga, Málaga, Spain, 2 Department of Physiology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, 3 Department of Pediatrics & Pediatric Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa, Madrid, Spain, 4 Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, 5 Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, 6 Centro de Tratamiento Ambulatorio Mijas Costa-Diputación de Málaga, Mijas, Spain, 7 Centro Provincial de Drogodependencia-Diputación de Málaga, Málaga, Spain, 8 Neurosciences Program, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain, 9 Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) del Parc de Salut MAR, Barcelona, Spain, 10 Department of Psychiatry, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, 11 Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Barcelona, Spain, 12 Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [javier.pavon@ibima.eu](mailto:javier.pavon@ibima.eu) (FJP); [fernando.rodriguez@ibima.eu](mailto:fernando.rodriguez@ibima.eu) (FRF)

## Abstract

Recent studies have identified biomarkers related to the severity and pathogenesis of cocaine addiction and common comorbid psychiatric disorders. Monitoring these plasma mediators may improve the stratification of cocaine users seeking treatment. Because the neurotrophic factors are involved in neural plasticity, neurogenesis and neuronal survival, we have determined plasma concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 binding protein 3 (IGFBP-3) in a cross-sectional study with abstinent cocaine users who sought outpatient treatment for cocaine ( $n = 100$ ) and age/body mass matched controls ( $n = 85$ ). Participants were assessed with the diagnostic interview 'Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders'. Plasma concentrations of these peptides were not different in cocaine users and controls. They were not associated with length of abstinence, duration of cocaine use or cocaine symptom severity. The pathological use of cocaine did not influence the association of IGF-1 with age observed in healthy subjects, but the correlation between IGF-1 and IGFBP-3 was not significantly detected. Correlation analyses were performed between these peptides and other molecules sensitive to addiction: BDNF concentrations were not associated with

Andalucía (PI0228-2013 and PI0823-2012); Departament d'Innovació, Universitats i Empresa, Generalitat de Catalunya (2014-SGR-680). JS, AS and FJP hold a "Miguel Servet" research contract from ISC-III (CP12/03109, CP14/00173 and CP14/00212, respectively). PR-S holds a "Río Hortega" research contract from ISC-III (CM13/0115). EC-O holds a "Sara Borrell" research contract from ISC-III (CD12/00455). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Rafael de la Torre is a Plos ONE Editorial Board member, but this does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria. The other authors declare no conflicts of interest.

inflammatory mediators, lipid derivatives or IGF-1 in cocaine users, but correlated with chemokines (fractalkine/CX3CL1 and SDF-1/CXCL12) and N-acyl-ethanolamines (N-palmitoyl-, N-oleoyl-, N-arachidonoyl-, N-linoleoyl- and N-dihomo- $\gamma$ -linolenoyl-ethanolamine) in controls; IGF-1 concentrations only showed association with IGFBP-3 concentrations in controls; and IGFBP-3 was only correlated with N-stearoyl-ethanolamine concentrations in cocaine users. Multiple substance use disorders and life-time comorbid psychopathologies were common in abstinent cocaine users. Interestingly, plasma BDNF concentrations were exclusively found to be decreased in users diagnosed with both primary and cocaine-induced disorders for mood and anxiety disorders. In summary, BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 were not affected by a history of pathological use of cocaine supported by the absence of associations with other molecules sensitive to cocaine addiction. However, BDNF was affected by comorbid mood disorders. Further research is necessary to elucidate the role of BDNF and IGF-1 in the transition to cocaine addiction and associated psychiatric comorbidity.

## Introduction

Chronic cocaine use induces long-lasting neurochemical, structural and behavioral adaptive changes thought to result from altered gene and protein expression within cerebral areas playing a critical role in addiction and reward [1]. Some of these changes are not fully reversed upon prolonged abstinence, and may represent an example of aberrant cocaine-induced neuroplastic changes related to cocaine dependence and an increased susceptibility to relapse to drug taking even after a long period of abstinence [2,3].

Furthermore, long-term cocaine use is commonly associated with altered executive functions, impaired emotional processing capacity and a higher incidence of comorbid mental disorders, particularly mood and anxiety disorders [4,5,6]. The diagnosis of psychiatric comorbidity is an important consideration for effective therapies to overcome cocaine addiction. However, the accurate diagnosis of comorbid psychiatric disorders in cocaine addicts has to face two major problems, the effects of cocaine can conceal symptoms of other mental disorders and the diagnosis is defined by manifestations rather than by direct biomarkers [7,8].

Focusing on this last point, the search for peripheral biomarkers for both psychiatric and substance use disorders has caused an increasing interest in addiction psychiatry research over the last few years. This growing research has generated a number of putative biomarkers, mainly involving the immune system and inflammatory responses, which still require replication in larger studies [9,10,11]. Recently, our group has studied the plasma profile of inflammatory mediators and fatty acid derivatives in abstinent cocaine users under outpatient treatment [12,13]. We found certain cytokines and chemokines that might serve as reliable biomarkers for pathological use of cocaine (i.e., binge use and/or chronic use) and symptom severity [12]. Additionally, several fatty acid derivatives such as endocannabinoids and congeners were biomarkers for cocaine use disorders and psychiatric comorbidity [13].

Neurotrophic factors are peptides that are known for their role in mediating neuronal plasticity and neuronal growth. In addition to neurons, these factors are produced by other cells and can affect and integrate neural, immune and endocrine systems. They have been reported to mediate the effects of drugs for the treatment of mental disorders but also play a relevant role in the acute and chronic responses produced by addictive drugs [14]. We have focused this

study on two trophic factors, which are found in plasma and involved in mediating neuronal plasticity, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the insulin-like growth factor 1 (IGF-1). In addition to IGF-1, we have also measured the IGF binding protein 3 (IGFBP-3) as relevant protein modulating its effects.

BDNF is a neurotrophin that participates in neuronal survival, differentiation, synaptogenesis and maintenance. Accumulating evidence suggests that alterations in the BDNF expression underlie a variety of psychiatric and neurological disorders. BDNF has been associated positively with some disorders (e.g., major depression and bipolar disorder) but there are also many non-specific or conflicting findings (schizophrenia and autism) [11,15]. Furthermore, BDNF has been also evaluated in cocaine addiction and comorbid disorders. Indeed, serum BDNF concentrations have been recently postulated as an indication of relapse risk during early recovery from cocaine dependence in a prospective study [16]. Another study performed by Corominas-Roso and colleagues showed that an increase in serum BDNF concentrations during early abstinence correlates with cocaine craving and abstinence symptoms [17], but interestingly these increased BDNF concentrations are not observed in patients displaying cocaine-induced psychosis [18].

IGF-1 is a trophic mediator regulated by growth hormone (GH) that may either be free or bound to binding proteins. IGFBP-3 is the most abundant binding protein in human blood and this complex prolongs the half-life of IGF-1. IGF-1 regulates proliferation, development and growth of neural cells (for recent reviews [19,20]). This peptide is also involved in the pathogenesis and evolution of psychiatric disorders in preclinical models [21,22] and clinical cases in old [23] and young [24] individuals. Thus, a cross-sectional study in older adults showed that the association between depressive symptoms and memory deficits is stronger with lower concentrations of circulating IGF-1 [23]. Young adults with GH deficiency exhibit anxious or depressed moods, which can be treated by GH therapy that increases IGF-1 concentrations. Furthermore, IGF-1 concentrations negatively correlate with depression, fatigue, tension and anxiety and positively with vigor and memory [24]. Regarding drugs of abuse in humans, IGF-1 concentrations have been assessed in alcohol and opiate dependence. Studies in alcohol dependents revealed a positive correlation between blood insulin level and alcohol craving, but not between alcohol craving and IGF-1 concentrations during either the active drinking phase or during abstinence [25]. In contrast to alcohol, serum IGF-1 is found to be elevated in opiate dependence [5].

The aim of the present cross-sectional study is to examine the plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in a cohort of abstinent cocaine users on an outpatient basis according to cocaine use history (duration of use, length of abstinence and cocaine symptom severity) and the comorbidity of other mental disorders. We found that plasma BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 are unaltered in abstinent cocaine users but they are affected by the presence of comorbid mood and anxiety disorders.

## Methods and Materials

### 1 Subjects and recruitment

All participants in the present cross-sectional study were white Caucasians grouped into abstinent cocaine users and healthy controls. One-hundred and ten cocaine users were enrolled from outpatient treatment programs for cocaine addiction in the province of Málaga (Spain) for a 36 month- period (2011–2013). Eighty healthy individuals were recruited in parallel from a multidisciplinary staff working at the Hospital Regional Universitario de Málaga.

Cocaine users had to meet eligibility criteria based on inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria were as follows:  $\geq 18$  years to 65 years of age, intranasal cocaine use, diagnosis of a



lifetime ‘pathological use’ of cocaine (chronic intoxication and/or binge), and abstinence from cocaine for at least 2 weeks before testing. The ‘pathological use’ of cocaine was determined through a psychiatric interview, while the abstinence of cocaine users was checked weekly by urine analysis in the outpatient treatment centers for cocaine addiction and plasma analyses [12]. Exclusion criteria were as follows: personal history of chronic diseases (e.g. cardiovascular, respiratory, renal, hepatic, neurological or endocrine diseases), personal history of cancer, infectious diseases, incapacitating cognitive alterations and/or severe schizophrenia, and pregnancy.

Controls were matched with the cocaine group for age and body mass index (BMI) and they were required to be  $\geq 18$  years to 65 years of age. In addition to the mentioned exclusion criteria for abstinent cocaine users, controls were excluded with: personal history of drug abuse and lifetime psychiatric disorders.

## 2 Clinical assessments

All cocaine users were evaluated according to ‘Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4<sup>th</sup> Edition-Text Revision’ (DSM-IV-TR) criteria, using the Spanish version of the ‘Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders’ (PRISM) [7,26]. Controls were initially evaluated by PRISM (for substance screening and abuse and dependence) and subsequently by the Spanish version of the ‘Composite International Diagnostic Interview’ (CIDI) for the detection of psychiatric disorders [27]. All the interviews were performed by experienced psychologists who had received both PRISM and CIDI training.

**2.1 Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases (PRISM).** The PRISM is a semi-structured interview that has demonstrated good psychometric properties in terms of test-retest reliability [28], inter-rater reliability [29] and validity [7] to diagnose psychiatric disorders among substance users.

Diagnoses were made using two time-frames: ‘current’ (criteria were met within the past year) and ‘past’ (criteria were met before the previous 12 months). Lifetime prevalence, taking into account both current and past diagnoses, was used to present the frequency of substance use disorders, non-substance use disorders and psychiatric comorbidity. In addition to the diagnoses of substance abuse and dependence, the PRISM differentiates ‘pathological use’ (chronic intoxication: substance use  $\geq 4$  days a week for  $\geq 3$  weeks; and/or binge use:  $\geq 3$  consecutive days of continuous substance use) from ‘occasional use’ (substance use less than 4 days a week, unless substance was used in a binge pattern).

The cocaine symptom severity was assessed combining the DSM-IV-TR criteria for cocaine use disorders: 7 dependence criteria (for diagnosis of dependence three or more co-occurring symptoms in a 12-month period are required); and 4 abuse criteria (one symptom is necessary for diagnosis of abuse), which is in agreement with the unidimensionality of DSM-5 criteria [30,31]. More details regarding analysis of cocaine symptom severity have been described previously (see [13]).

## 3 Laboratory methods for human samples

**3.1 Collection and analysis of plasma samples.** Blood samples were obtained in the morning (09:00–11:00 h AM) after fasting for 8–12 h (previous to the psychiatric interviews). Venous blood was collected into 10 mL K<sub>2</sub>-EDTA tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and processed to obtain plasma. Blood samples were centrifuged at 2,200 $\times$ g for 15 min (4°C) and individually assayed for detecting infectious diseases by 3 rapid tests for HIV (Retroscreen HIV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd, Goa, India), hepatitis B (HBsAg Test, Toyo Diagnostics-Turkclab Inc., Izmir, Turkey) and hepatitis C (Flaviscreen HCV, QualPro

Diagnostics-Tulip Group Ltd, Goa, India). Samples testing positive were discarded following safety protocols.

Plasma analyses for cocaine metabolite (Benzoylecgonine Specific Direct ELISA Kit Immunoanalysis, Pomona, CA, USA) were performed to confirm cocaine abstinence. Four cocaine users who tested negative for drugs of abuse in urine analyses at the outpatient treatment centers for cocaine addiction were positive for benzoylecgonine in plasma, and these cocaine users were excluded from this study. Plasma samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analyses.

**3.2 Multiplex immunoassay analysis.** A Bio-Plex Suspension Array System 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to quantify the plasma concentrations of anti- and pro-inflammatory cytokines, homeostatic and pro-inflammatory chemokines and BDNF following the manufacturer's instructions as previously reported [12]. Human protein panels were used to simultaneously detect the following analytes: Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ); interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ); interleukin-6 (IL-6); interleukin-10 (IL-10); CX3CL1 [Chemokine (C-X<sub>3</sub>-C motif) ligand 1], commonly referred to as fractalkine; CCL2 [Chemokine (C-C motif) ligand 2], also referred to as monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1); CXCL12 [Chemokine (C-X-C motif) ligand 12], also referred to as stromal cell-derived factor-1 (SDF-1); and BDNF. Raw data (mean fluorescence intensity) were analyzed using the Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Data of plasma concentrations (pg of protein/mL) were used to perform multiple correlation studies and analyses of the means.

**3.3 Radioimmunoassay analysis for IGF1 and IGFBP-3.** Plasma concentrations of total IGF-1 were estimated by double antibody radioimmunoassay (RIA), after removal of serum IGFBPs by acid-ethanol extraction. To confirm the removal of IGFBPs, extracted and non-extracted plasma fractions were incubated with  $^{125}\text{I}$ -IGF-1 at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Dextran charcoal was used to separate the bound and free tracers. The IGF-1 antiserum (UB2-495) was a gift from Drs Underwood and Van Wisk distributed by the Hormone Distribution Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) through the National Hormone and Pituitary Program. Concentrations of IGF-1 were expressed in terms of rat IGF-1 from Gropep Bioreagents Pty Ltd (Adelaide, SA, Australia). Test sensitivity was 10 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation was 8%. All samples were run in the same batch.

Plasma IGFBP-3 concentration was determined in duplicate by RIA using a commercially available kit (Mediagnost GmbH, Reutlingen, Germany) following the manufacturer's protocol. The assay sensitivity was 500 pg/mL and the intra-assay coefficient of variation was 7.5%.

**3.4 Quantification of acyl derivatives.** The following lipid derivatives and their respective deuterated forms were used for quantification: N-stearoyl-ethanolamine (SEA), N-palmitoyl-ethanolamine (PEA) and PEA-d<sub>4</sub>, N-oleoyl-ethanolamine (OEA) and OEA-d<sub>4</sub>, N-palmitoleoyl-ethanolamine (POEA), N-arachidonoyl-ethanolamine (AEA) and AEA-d<sub>4</sub>, N-linoleoyl-ethanolamine (LEA) and LEA-d<sub>4</sub>, N-docosahexaenoyl-ethanolamine (DHEA) and DHEA-d<sub>4</sub>, N-dihomo- $\gamma$ -linolenoyl-ethanolamine (DGLEA), 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) and 2-AG-d<sub>5</sub>, and 2-linoleoyl-glycerol (2-LG). PEA-d<sub>4</sub>, OEA-d<sub>4</sub> and AEA-d<sub>4</sub> were used for quantification of POEA, SEA and DGLEA respectively, since their deuterated forms were not commercially available. All reagents were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Sample extraction and the chromatographic separation were performed in a Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) as previously reported [13]. The tandem quadrupole mass spectrometer operated on the positive electrospray mode. The multiple reaction monitoring mode was used for the analysis with the following precursor to product ion transitions: m/z 328.1/62 for SEA, m/z 300.1/62 for PEA, m/z 304.4/66 for PEA-d<sub>4</sub>, m/z 326.1/62 for OEA, m/z 330.4/66 for OEA-d<sub>4</sub>, m/z 298.2/62 for POEA, m/z 348.3/62 for AEA, m/z 352.2/66 for AEA-d<sub>4</sub>, m/z 324.5/62 for LEA, m/z 328.5/



66 for LEA-d<sub>4</sub>, m/z 372.6/62 for DHEA, m/z 376.3/66 for DHEA-d<sub>4</sub>, m/z 350.2/62 for DGLEA, m/z 379.2/287 for 2-AG, m/z 384.3/287 for 2-AG-d<sub>5</sub> and m/z 355.2/263 for 2-LG. A six-point external calibration curve prepared in the mobile phase (10:90, A:B) and spiked with 0.4–25 ng of N-acyl-ethanolamines and 0.8–50 ng of 2-acyl-glycerols was used for the quantification [32]. Data of plasma concentration (ng of acyl derivative /mL) were used to perform multiple correlation studies.

## 4 Ethics statement

Written informed consent was obtained from each subject after they had received a complete description of the present study and had been given the chance to discuss any questions or issues. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the Hospital Regional Universitario de Málaga (07/19/2009 PND049/2009 and PI0228–2013; CEI Provincial de Málaga) and therefore were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (seventh revision in 2013, Fortaleza, Brazil).

## 5 Statistical analyses

All data for graphs and tables are expressed as number and percentage of subjects [ $n$  (%)] or mean and standard deviation (SD) of concentrations [mean (SD)]. The significance of differences in categorical variables was determined by using the Fisher's exact test; while continuous variables were evaluated by different statistical approaches according to the number of comparisons and the distribution of variables. For comparisons of two groups, the Student's *t*-test was used for normally distributed continuous variables and the Mann-Whitney *U* test was used as non-parametric test. For comparisons of three or more groups, one-way and analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction for multiple comparisons was used for normal distributions whereas the Kruskal–Wallis analysis with the Dunn's post test was used as non-parametric analysis. Correlation analyses were performed by using the Pearson's correlation coefficient (*r*) for continuous variables with normal distribution and Spearman's rank correlation coefficient (*rho*) for continuous variables without normality and discrete variables. The Holm-Bonferroni correction was employed for multiple comparisons of correlation coefficients for controlling the type I errors. The normal distribution of variables was evaluated using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Thresholds of 0.05 were applied for *p*-values and adjusted *p*-values. Statistical analyses were performed using the computer program Graph-Pad Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### 1 Sample demographics and clinical characteristics

A total of 185 subjects both sexes were selected for this study and grouped into the cocaine ( $n = 100$ ) and control ( $n = 85$ ) groups. The average participant was a 36–37 year-old male with a BMI of 26 (weighing 75–77 kg). A description of the sample is presented in [Table 1](#).

Cocaine users displayed cocaine abstinence for 234.7 (436.3) days [mode: 30 days (range: 2,555)]. The percentages of cocaine users treated for substance use and psychological condition were 81.0% and 35.0% respectively. In contrast, only 17.6% of controls received psychological treatments.

Cocaine use disorders were the most prevalent lifetime substance use disorders (89%) followed by lifetime alcohol (64%), cannabis (23%), benzodiazepines (8%) and heroin (8%) use disorders (not including caffeine or nicotine).

**Table 1. Baseline socio-demographic variables and lifetime psychiatric and substance use disorders.**

VARIABLE		COCAINE GROUP <i>n</i> = 100	CONTROL GROUP <i>n</i> = 85	p-value
AGE ( $\geq 18$ ) [MEAN (SD)]		35.8 (8.9)	37.3 (10.7)	0.299 <sup>a</sup>
SEX [ <i>n</i> (%)]	Women	18 (18.0)	25 (29.4)	0.081 <sup>b</sup>
	Men	82 (82.0)	60 (70.6)	
BODY MASS [MEAN (SD)]	Body Mass Index	25.5 (4.5)	26.1 (4.0)	0.343 <sup>a</sup>
	Weight (kg)	77.1 (14.4)	75.3 (11.0)	0.337 <sup>a</sup>
PSYCHOLOGICAL TREATMENT (EVER) [ <i>n</i> (%)]	No	67 (67.0)	80 (94.1)	<0.001 <sup>b</sup>
	Yes	35 (35.0)	5 (5.9)	
SUBSTANCE USE TREATMENT (EVER) [ <i>n</i> (%)]	No	21 (21.0)	85 (100)	<0.001 <sup>b</sup>
	Yes	81 (81.0)	0 (0.0)	
LIFETIME SUBSTANCE USE DISORDERS [ <i>n</i> (%)]	Cocaine	89 (89.0)	-	-
	Alcohol	64 (64.0)	-	
	Cannabis	23 (23.0)	-	
	Benzodiazepines	8 (8.0)	-	
	Heroin	8 (8.0)	-	
	Hallucinogens	6 (6.0)	-	
	Others	7 (7.0)	-	
LIFETIME COCAINE USE DISORDERS [ <i>n</i> (%)]	Abuse or Dependence	89 (89.0)	-	-
	Abuse	78 (78.0)	-	
	Dependence	84 (84.0)	-	
LIFETIME COMMON PSYCHIATRIC DISORDERS [ <i>n</i> (%)]	Mood Disorders	33 (33.0)	-	-
	Anxiety Disorders	22 (22.0)	-	
	Psychosis Disorders	13 (13.0)	-	
	Personality Disorders	31 (31.0)	-	

<sup>a</sup> p-value from Student's t-test.

<sup>b</sup> p-value from Fisher's exact test or Chi-square test.

doi:10.1371/journal.pone.0118610.t001

Regarding common psychiatric disorders assessed with the PRISM, we found high prevalences of comorbid mood (33%), anxiety (22%), psychosis (13%) and personality (31%) disorders. Therefore, a vast majority of cocaine users who participated in this study were diagnosed with substance use disorders or multiple substance use disorders and psychiatric comorbidity.

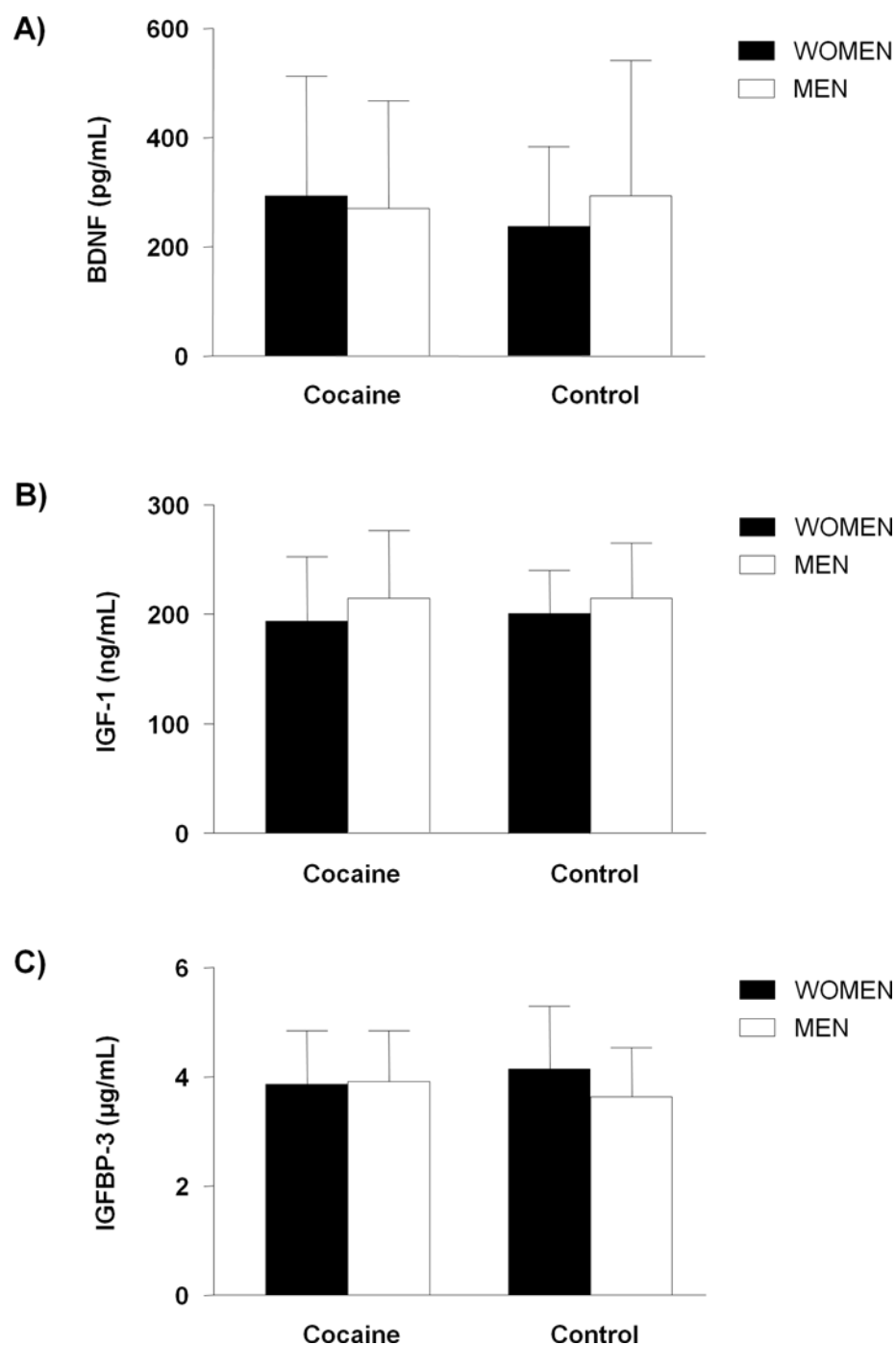
## 2 Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3

Mean plasma concentrations for BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 were similar in both groups. The plasma concentrations of each protein were as follows:  $274.9 \pm 200.3$  pg/mL and  $269.4 \pm 242.7$  pg/mL for BDNF,  $212.2 \pm 63.9$  ng/mL and  $210.7 \pm 51.2$  ng/mL for IGF-1, and  $3.91 \pm 0.94$  µg/mL and  $3.78 \pm 0.93$  µg/mL for IGFBP-3, in the cocaine and control groups respectively.

**2.1 Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to sex.** As indicated in Fig. 1, we examined whether the sex composition in the cocaine and control groups affects the plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3. A two-way ANOVA was performed taking into consideration cocaine use and sex as factors. We did not observe main effects or interaction of these factors on the concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 between men and women in both groups.

**2.2 Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to age.** The influence of age on growth factors has been extensively described, especially with IGF-1 [33,34,35].

Figure 1

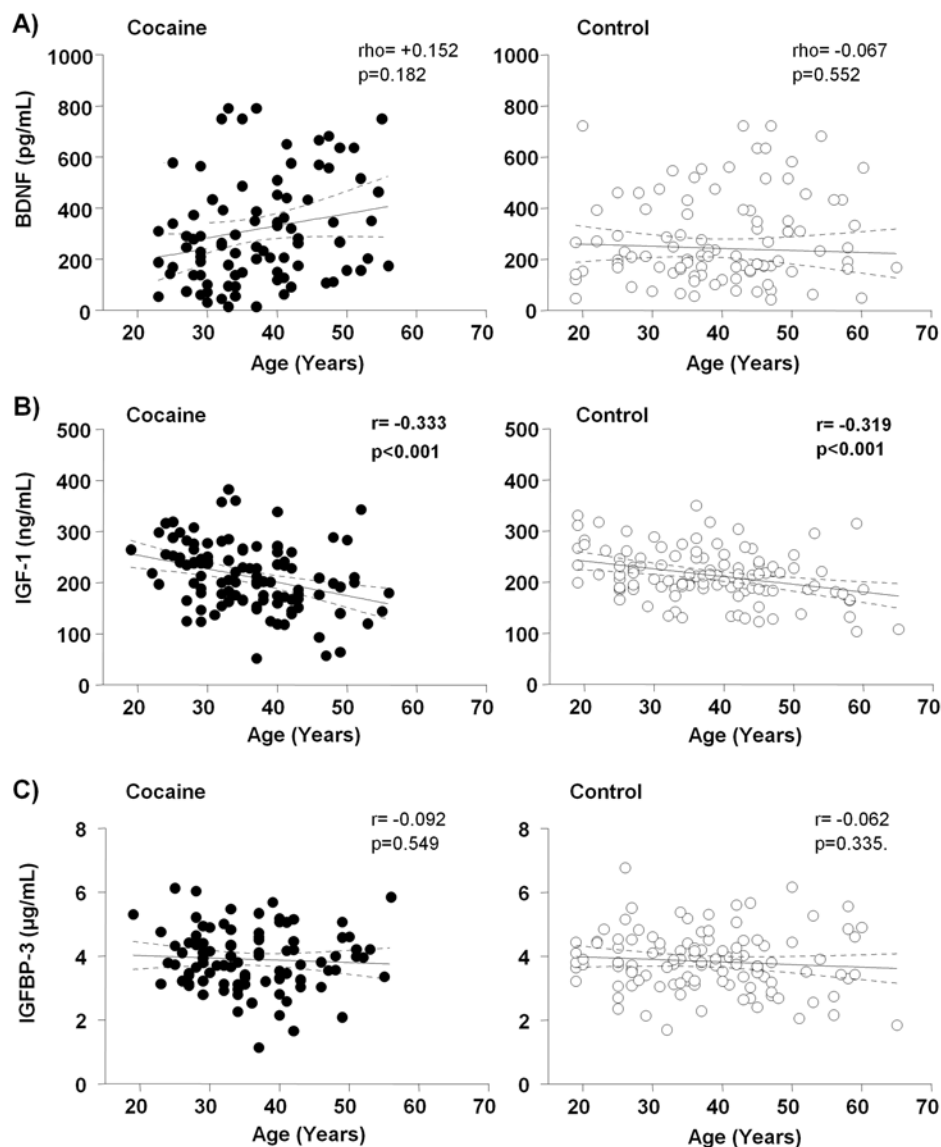


**Fig 1. Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 according to sex in abstinent cocaine users and control subjects. A) BDNF (pg/mL); B) IGF-1 (ng/mL); and C) IGFBP-3 (μg/mL).** Bars are the means and SD. Data were analyzed by two-way analyses (cocaine use [cocaine group and control group] and sex [women and men]).

doi:10.1371/journal.pone.0118610.g001

Correlation analyses were performed between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 or IGFBP-3 and age for each study group, as shown in Fig. 2. The plasma IGF-1 concentrations were negatively correlated with age in the cocaine ( $r = -0.33$ ,  $p < 0.001$ ) and control ( $r = -0.32$ ,  $p < 0.001$ ) groups using the Pearson's correlation coefficient for normal distributions. These correlations were not significant for BDNF and IGFBP-3 concentrations.

Figure 2



**Fig 2. Correlation analyses between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 and age in abstinent cocaine users (black circles) and control subjects (white circles). A) BDNF (pg/mL); B) IGF-1 (ng/mL); and C) IGFBP-3 ( $\mu\text{g/mL}$ ).** Dots are individual values. (r) Pearson's correlation coefficient; ( $\rho$ ) Spearman's correlation coefficient; (p) p-value for statistical significance.

doi:10.1371/journal.pone.0118610.g002

### 3 Multiple correlation analyses of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 with other plasma molecules sensitive to cocaine addiction

We determined the degree of association among these peptides (BDNF, IGF-1 and IGFBP-3) and other plasma mediators in the cocaine and control groups. Recently, we have reported that certain circulating pro-inflammatory mediators and fatty acid derivatives are influenced by cocaine addiction [12,13]. Thus, we examined the degree of association of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 with these molecules and among themselves in the sample. The significances of the resulting correlation coefficients were statistically corrected using the Holm-Bonferroni method to counteract the problem of multiple comparisons for the control and cocaine groups.

**3.1 BDNF.** Plasma concentrations of BDNF showed a non-normal distribution in abstinent cocaine subjects and controls and the correlation coefficients calculated were rho (Table 2).

In the cocaine group, BDNF concentrations did not correlate with the concentrations of chemokines (CX<sub>3</sub>CL1, CCL2 and CXCL12), cytokines (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 and IL10), fatty acid derivatives (N-acyl-ethanolamines and 2-acyl-glycerols), IGF-1 or IGFBP-3. In contrast, BDNF concentrations correlated positively with the concentrations of certain chemokines and N-acyl-ethanolamines in the control group. Concretely, BDNF significantly correlated with CX<sub>3</sub>CL1 (rho = +0.69, adjusted p<0.001) and CXCL12 (rho = +0.78, adjusted p<0.001); PEA

**Table 2. Multiple correlations between plasma concentrations of BDNF and other plasma molecules in the cocaine group.**

MULTIPLE CORRELATION ANALYSIS <sup>1,2</sup>						
VARIABLE	BDNF					
	COCAINE			CONTROL		
	rho	p-value	adjusted p-value	rho	p-value	adjusted p-value
CX <sub>3</sub> CL1 (fractalkine)	-0.094	0.441	ns	<b>+0.693</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
CCL2 (MCP-1)	-0.005	0.968	ns	+0.009	0.941	ns
CXCL12 (SDF-1)	-0.110	0.363	ns	<b>+0.784</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
IL1 $\beta$	-0.109	0.372	ns	-0.135	0.269	ns
TNF $\alpha$	-0.133	0.272	ns	-0.189	0.120	ns
IL6	-0.260	0.029	ns	+0.054	0.660	ns
IL10	-0.110	0.365	ns	+0.031	0.799	ns
SEA	-0.047	0.695	ns	+0.325	<b>0.007</b>	ns
PEA	-0.058	0.629	ns	<b>+0.492</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>
OEA	-0.133	0.270	ns	<b>+0.400</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.033</b>
POEA	-0.037	0.760	ns	+0.331	<b>0.006</b>	ns
AEA	-0.150	0.213	ns	<b>+0.447</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.005</b>
LEA	-0.187	0.119	ns	<b>+0.423</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.014</b>
DGLEA	-0.170	0.156	ns	<b>+0.524</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>
DHEA	+0.009	0.938	ns	+0.301	<b>0.012</b>	ns
2-AG	+0.074	0.538	ns	+0.054	0.661	ns
2-LG	-0.056	0.640	ns	+0.122	0.320	ns
IGF-1	-0.157	0.210	ns	-0.111	0.291	ns
IGFBP-3	-0.170	0.156	ns	-0.221	0.106	ns

<sup>1</sup> All variables were assessed for normality to select the adequate correlation coefficient (r; rho).

<sup>2</sup> Adjusted p-values were calculated using Holm-Bonferroni correction (3x18 correlations per group).

Abbreviations: ns, non-significant.

Table 3. Multiple correlations between plasma concentrations of IGF-1 and other plasma molecules in the cocaine group.

VARIABLE	MULTIPLE CORRELATION ANALYSIS <sup>1,2</sup>					
	IGF-1					
	COCAINE			CONTROL		
	r	p-value	adjusted p-value	r	p-value	adjusted p-value
CX <sub>3</sub> CL1 (fractalkine)	-0.062	0.608	ns	-0.062	0.792	ns
CCL2 (MCP-1)	+0.087	0.472	ns	+0.087	0.137	ns
CXCL12 (SDF-1)	+0.013	0.914	ns	+0.013	0.845	ns
IL1 $\beta$	+0.067	0.582	ns	+0.067	0.180	ns
TNF $\alpha$	+0.048	0.693	ns	+0.048	0.638	ns
IL6	+0.078	0.519	ns	+0.078	0.520	ns
IL10	+0.089	0.462	ns	+0.089	0.799	ns
SEA	+0.086	0.436	ns	+0.086	0.187	ns
PEA	+0.054	0.624	ns	-0.281	<b>0.019</b>	ns
OEA	-0.064	0.560	ns	-0.264	<b>0.028</b>	ns
POEA	-0.142	0.195	ns	+0.006	0.964	ns
AEA	-0.085	0.437	ns	-0.186	0.125	ns
LEA	-0.095	0.387	ns	-0.133	0.275	ns
DGLEA	-0.018	0.873	ns	-0.184	0.131	ns
DHEA	+0.171	0.118	ns	-0.309	0.010	ns
2-AG	-0.120	0.275	ns	-0.097	0.430	ns
2-LG	-0.074	0.503	ns	-0.119	0.331	ns
IGFBP-3	+0.327	<b>0.006</b>	ns	<b>+0.463</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>

<sup>1</sup> All variables were assessed for normality to select the adequate correlation coefficient (r; rho).

<sup>2</sup> Adjusted p-values were calculated using Holm-Bonferroni correction (3x18 correlations per group).

Abbreviations: ns, non-significant.

doi:10.1371/journal.pone.0118610.t003

(rho = +0.49, adjusted p<0.01), OEA (rho = +0.40, adjusted p<0.05), AEA (rho = +0.45, adjusted p<0.01), LEA (rho = +0.42, adjusted p<0.05) and DGLEA (rho = +0.52, adjusted p<0.01). Although BDNF was initially associated with other N-acyl-ethanolamines (SEA, POEA and DHEA), the statistical adjustment for multiple comparisons rejected them.

**3.2 IGF-1.** Plasma concentrations of IGF-1 were normally distributed in the cocaine and control groups and Pearson's correlation coefficients (r) were calculated for all comparisons. As shown in Table 3, IGF-1 concentrations did not correlate with the concentrations of the plasma molecules that were assessed in the cocaine group. Only we found an initial association with its binding protein IGFBP-3 prior to apply the correction test that was rejected. However, in the control group this positive correlation between the concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 was significant after adjusting the significance (r = +0.46, adjusted p<0.01). Similar to BDNF, IGF-1 showed correlations with some N-acyl-ethanolamines (PEA and OEA) that were also discarded after correcting them.

**3.3 IGFBP-3.** As indicated in Table 4, IGFBP-3 concentrations passed the normality test in both groups and Pearson's correlation coefficients (r) were calculated. In the cocaine group, plasma concentrations of IGFBP-3 were not associated with the plasma mediators that were examined with the exception of SEA. Thus, plasma concentrations of IGFBP-3 correlated positively with SEA (r = +0.40; adjusted p<0.05). Regarding control subjects, IGFBP-3 concentrations were not correlated with the rest of molecules although some positive

Table 4. Multiple correlations between plasma concentrations of IGFBP-3 and other plasma molecules in the cocaine group.

VARIABLE	MULTIPLE CORRELATION ANALYSIS <sup>1,2</sup>					
	IGFBP-3					
	COCAINE			CONTROL		
	r	p-value	adjusted p-value	r	p-value	adjusted p-value
CX <sub>3</sub> CL1 (fractalkine)	-0.006	0.963	ns	+0.113	0.356	ns
CCL2 (MCP-1)	+0.126	0.303	ns	+0.171	0.159	ns
CXCL12 (SDF-1)	-0.113	0.357	ns	+0.141	0.250	ns
IL1 $\beta$	-0.062	0.611	ns	+0.317	<b>0.008</b>	ns
TNF $\alpha$	-0.047	0.699	ns	+0.233	0.054	ns
IL6	+0.067	0.587	ns	+0.321	<b>0.007</b>	ns
IL10	-0.052	0.672	ns	+0.244	<b>0.044</b>	ns
SEA	<b>+0.397</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>	-0.091	0.459	ns
PEA	+0.216	0.058	ns	-0.048	0.696	ns
OEA	-0.226	0.056	ns	+0.115	0.348	ns
POEA	-0.121	0.272	ns	+0.046	0.710	ns
AEA	-0.079	0.473	ns	+0.125	0.307	ns
LEA	+0.038	0.732	ns	-0.003	0.979	ns
DGLEA	-0.084	0.446	ns	+0.006	0.963	ns
DHEA	+0.042	0.707	ns	+0.079	0.521	ns
2-AG	+0.010	0.926	ns	+0.145	0.235	ns
2-LG	+0.093	0.398	ns	+0.132	0.280	ns

<sup>1</sup> All variables were assessed for normality to select the adequate correlation coefficient (r; rho).

<sup>2</sup> Adjusted p-values were calculated using Holm-Bonferroni correction (3x18 correlations per group).

Abbreviations: ns, non-significant.

doi:10.1371/journal.pone.0118610.t004

associations were observed in paired-comparisons with cytokines (IL1 $\beta$ , IL6 and IL10) without adjustment for multiple comparisons.

Overall, while BDNF concentrations correlated positively with chemokines and N-acyl-ethanolamines in the control group, IGFBP-3 was found to be positively associated only with SEA in the cocaine group. Moreover, IGF-1 and IGFBP-3 correlated positively in the control group but not in the cocaine group.

#### 4 Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to variables associated with cocaine use

In the cocaine group, correlation analyses were performed between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 or IGFBP-3 and length of cocaine abstinence (days) and duration of cocaine use (years) (S1 Fig.). Because both length of cocaine abstinence and duration of cocaine were variables with a non-normal distribution, Spearman's rank correlation coefficients (rho) were used for determining associations. However, we observed no correlations between these mediators and variables related to abstinence and cocaine use.

Additional correlation analyses were performed between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 or IGFBP-3 and individual scores of DSM-IV-TR criteria for cocaine abuse and dependence. The concentrations of these peptides were not associated with the cocaine symptom severity (S2 Fig.). As expected, the cocaine group displayed an increased number of criteria for cocaine use disorders (7.3 $\pm$ 3.3 criteria) which indicates a high cocaine symptom severity.



**Table 5. Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in abstinent cocaine users grouped by diagnosis of common psychiatric disorders in substance users.**

VARIABLE				
PSYCHIATRIC DISORDER	n (%)	BDNF pg/mL [mean (SD)]	IGF-1 ng/mL [mean (SD)]	IGFBP-3 µg/mL [mean (SD)]
<b>MOOD DISORDERS<sup>1</sup></b>	33 (33.0)	240.2 (177.4)	213.1 (83.4)	3.83 (0.99)
Primary	11 (11.0)	297.0 (223.2)	246.4 (59.7)	4.31 (0.73)
Cocaine-induced	17 (18.0)	227.6 (150.4)	196.5 (91.8)	3.83 (1.07)
Primary & Cocaine-induced	5 (5.0)	<b>131.8 (66.7)<sup>a</sup></b>	186.5 (38.8)	3.30 (0.67)
<b>NO MOOD DISORDERS</b>	67 (67.0)	294.9 (211.4)	210.8 (52.5)	3.87 (0.92)
<b>ANXIETY DISORDERS</b>	22 (22.0)	268.2 (171.1)	191.6 (61.9)	3.80 (0.91)
Primary	12 (12.0)	278.9 (170.0)	182.3 (67.6)	3.84 (0.87)
Cocaine-induced	7 (7.0)	293.6 (199.3)	199.9 (67.2)	4.11 (1.09)
Primary & Cocaine-induced	3 (3.0)	<b>137.9 (0.9)<sup>b,*</sup></b>	209.8 (16.0)	3.16 (0.75)
<b>NO ANXIETY DISORDERS</b>	78 (78.0)	276.8 (208.9)	217.1 (63.7)	3.94 (0.95)
<b>PSYCHOTIC DISORDERS</b>	13 (13.0)	262.9 (209.9)	206.7 (59.3)	3.83 (0.84)
Primary	2 (2.0)	163.4 (168.1)	178.5 (0.0)	3.49 (0.30)
Cocaine-induced	11 (11.0)	281.0 (218.4)	211.0 (62.9)	3.89 (0.90)
Primary & Cocaine-induced	-	-	-	-
<b>NO PSYCHOTIC DISORDERS</b>	87 (87.0)	277.2 (199.9)	213.0 (64.8)	3.92 (0.95)
<b>PERSONALITY DISORDERS (CLUSTER-B)<sup>2</sup></b>	31 (31.0)	232.8 (176.8)	197.0 (64.5)	3.83 (0.91)
<b>NO PERSONALITY DISORDERS</b>	69 (69.0)	294.5 (208.9)	218.1 (63.4)	3.94 (0.95)
<b>CONTROL GROUP</b>		<b>269.4 (242.7)</b>	<b>210.7 (51.2)</b>	<b>3.78 (0.93)</b>

<sup>1</sup> Mood disorders include major depressive disorder, dysthymic disorder, bipolar disorders (mania and hypomania) and cocaine-induced mood disorders.

<sup>2</sup> Cluster B personality disorders include borderline and antisocial personality disorders.

<sup>a</sup> p<0.05 denotes significant differences compared to the *no mood disorders* subgroup.

<sup>b</sup> p<0.05 denotes significant differences compared to the *no anxiety disorders* subgroup.

\* p<0.05 denotes significant differences compared to the control group.

doi:10.1371/journal.pone.0118610.t005

## 5 Psychiatric comorbidity and substance use disorders

Because all outpatient cocaine users display high rates of comorbid psychiatric disorders, we evaluated plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in the most common psychiatric comorbidities among substance users, as shown in [Table 5](#).

The DSM-IV-TR Axis I disorders included mood disorders, anxiety and psychosis. Considering the exclusive diagnoses, the prevalences of cocaine-induced mood and psychotic (18.0% and 11.0% respectively) disorders were higher than the primary mood and psychotic (11.0% and 2.0% respectively) disorders, unlike cocaine-induced and primary anxiety disorders (7.0% and 12.0% respectively). Also, some cocaine users were diagnosed with both primary and cocaine-induced mood ( $n = 5$ ) and anxiety ( $n = 3$ ) disorders. With respect to personality disorders, the prevalence reached a 31.0%.

Considering the plasma concentrations of BDNF, IGF.1 and IFGBP-3 in these outpatient users diagnosed with psychiatric comorbidities, we only observed significant changes in BDNF concentrations. Concretely, abstinent cocaine users diagnosed with both primary and cocaine-induced disorders (for mood or anxiety disorders) displayed significant decreases in plasma BDNF concentrations ( $p<0.05$ ) compared to those users with no mood disorders or no anxiety. Additionally, the decrease in BDNF concentrations in subjects diagnosed with both primary and cocaine-induced anxiety disorders were also significant ( $p<0.05$ ) relative to the control group.



Regarding IGF-1 and IGFBP-3, we observed no changes in their plasma concentrations by the presence of psychiatric comorbidities.

## Discussion

The present exploratory and cross-sectional study found that the plasma concentrations of BDNF and IGF-1 are unaltered by a lifetime pathological use of cocaine in abstinent cocaine users under treatment. Indeed, plasma concentrations of these factors were not influenced by the length of abstinence, duration of cocaine use or cocaine symptom severity. The association of plasma IGF-1 concentrations with age was not affected by the pathological use of cocaine, although the association of IGF-1 and IGFBP-3 did not reach statistical significance after correcting it in abstinent cocaine users. Additionally, the correlations of BDNF concentrations with chemokines and N-acyl-ethanolamines in the control group were not observed in cocaine subjects. However, we detected a positive correlation between the concentrations of IGFBP-3 and SEA in the cocaine group. On the other hand, we found an elevated prevalence of comorbid psychiatric disorders in these patients with polysubstance use and changes in BDNF concentrations related to the diagnosis of mood and anxiety disorders. Thus, plasma BDNF concentrations were reduced in cocaine users diagnosed with both primary and cocaine-induced mood and anxiety disorders.

### BDNF in abstinent cocaine users

Although we found no changes in BDNF concentrations, several clinical studies have reported changes in the serum BDNF concentrations of cocaine dependents during abstinence, suggesting that BDNF is a reliable biomarker for cocaine addiction. A first study in cocaine dependent individuals found that BDNF concentrations are increased during early abstinence, and the elevated BDNF is predictive of relapse risk during early recovery from cocaine dependence [16]. Related to this finding, another study reported that BDNF concentrations are positively correlated with cocaine craving and abstinence symptoms [17]. Similarly, more recent studies in crack cocaine dependent individuals have found high blood BDNF concentrations during early abstinence [36] and negative correlations with severity [37] and amount of cocaine used [38]. All these prospective studies were conducted in cocaine addicts following inpatient detoxification treatments during 2–4 weeks, unlike our study that is a cross-sectional study in cocaine users seeking treatment in outpatient programs. Consequently, we have a single measure for BDNF from each cocaine user, variable periods of abstinence and uncontrolled environmental factors (inherent in outpatient treatments) that may be interfering with the present data.

### IGF-1 and IGFBP-3 in abstinent cocaine users

Numerous studies in mammals have reported that IGF-1 concentrations decline with advancing age, showing the association of IGF-1 with longevity and age-related diseases (e.g., cancer, cardiovascular disease, diabetes, osteoporosis, and neurodegenerative diseases) [39,40,41]. We observed that IGF-1 concentrations correlated significantly with the age of the participants. According to the present results, the history of a pathological use of cocaine did not influence the association of IGF-1 concentrations and aging because the significant and negative correlation between both variables was identical to the control group. However, we did not evaluate the cognitive impairment in the sample [42].

Focusing on cocaine addiction, we observed no changes in the plasma concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 of abstinent users and concentrations did not correlate with addiction-related variables such as severity cocaine symptom, abstinence or duration of cocaine use. We did not find literature about an association between IGF-1 and cocaine but other drugs of

abuse have been investigated. Studies in rodents suggest that IGF-1 is altered in cerebral areas related to the development of addiction after chronic exposure to morphine [43,44]. In humans, a recent study in patients with opiate use dependence has demonstrated that serum IGF-1 is elevated [5]. In addition to opiates, various studies evaluating IGF-1 have been conducted in alcohol dependent subjects but the authors did not observe any interaction between alcohol addiction and this peptide in blood or brain [25,45]. However, a recent study in alcohol dependent patients has found that IGF-1 might play a role in the cognitive function in these subjects [46].

### Lack of association with biomarkers of cocaine addiction

Overall, the lack of influence of cocaine addiction on plasma concentrations of BDNF and IGF-1 was confirmed through multiple analyses of correlation coefficients of these factors with other circulating molecules sensitive to cocaine addiction and/or psychiatric comorbidity in cocaine abstinent subjects from similar observational studies [12,13]. Chemokines and pro-inflammatory mediators are affected by the cocaine symptom severity, while anti-inflammatory fatty acid derivatives such as endocannabinoids and their congeners are affected by the history of pathological use of cocaine and the presence of comorbid disorders. Thus, the significant correlations between these cocaine-sensitive molecules and BDNF and IGF-1 (and IGFBP-3) in controls vanished in the cocaine group. However, we observed only one significant correlation after multiple comparisons in the cocaine group, in particular IGFBP-3 and SEA concentrations, but the SEA concentrations is not affected by cocaine use unlike other N-acyl-ethanolamines [13].

Because IGF-1 forms a ternary complex with IGFBP-3 [47], we also studied the association between both peptides. We detected a positive correlation between plasma concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 in the control participants, but such association was weakly affected by the lifetime pathological use of cocaine.

### BDNF and IGF-1 in abstinent cocaine users with psychiatric comorbidity

Similar to these previous cross-sectional studies in abstinent cocaine users recruited from outpatient programs, we have detected a high prevalence of comorbid psychiatric disorders, approximately 60% [12,13]. Although these plasma peptide concentrations were unaltered in cocaine users, we examined these concentrations according to the diagnosis of primary and cocaine-induced disorders. Substantial evidence indicates neurotrophic/growth factors such as BDNF and IGF-1 are involved in the pathogenesis of common psychiatric disorders. We have indeed observed in this study changes in circulating concentrations of these neurotrophic factors in mood and anxiety disorders, especially in BDNF.

### BDNF in psychiatric comorbidity

Current literature on BDNF and mental disorders is particularly focused on depressive and bipolar disorders. Thus, circulating concentrations of BDNF are decreased in depressed patients compared to controls and that they increase significantly with antidepressant treatment [48,49,50]. The reduction of plasma BDNF concentration has also been related to suicidal behavior in major depression [51] whereas other studies in bipolar patients have found a significant association with the severity of depression [52,53], suggesting that plasma BDNF concentrations may be a marker of depression and/or bipolar disorder. Our findings are consistent with the literature because BDNF concentrations in cocaine users diagnosed with mood disorders, both primary and cocaine-induced, were found to be decreased. However, only five cocaine users were identified with this complicated diagnosis and, therefore, the statistical

significance of this reduction may be called into question. We observed no differences in the BDNF concentrations of those abstinent subjects displaying primary mood disorders or cocaine-induced mood disorders separately.

BDNF has also emerged as a potential biomarker for anxiety from preclinical studies in rodents [54]. Translational studies have reported that early stress correlates negatively with peripheral BDNF concentrations later in life [55]. A recent review of clinical studies showed that BDNF concentrations were lower in individuals with any anxiety disorder compared to those without anxiety but this is not consistent across the literature [56]. In support of this, abstinent cocaine users diagnosed with both primary and cocaine-induced anxiety disorders exhibited a significant decrease in plasma BDNF, as seen previously with mood disorders. Again, the main limitation of this observation is related to the reduced number of individuals with this dual (primary and cocaine-induced anxiety) comorbid diagnosis.

### IGF-1 in psychiatric comorbidity

Several studies in old and young populations have shown the association between IGF-1 concentrations and depressive symptoms [23,24]. It has been reported that plasma IGF-1 concentrations are increased in acute depressed patients [57] and similarly, another study demonstrated that patients with bipolar disorder have elevated IGF-1 concentrations [58]. Although our data are consistent with these observations and cocaine users with primary mood disorders displayed an increase in plasma IGF-1 and IGFBP-3 concentrations, these increases did not reach statistical significance relative to the control group and abstinent users without mood disorders.

We need to perform additional studies to establish the mechanisms of action of these trophic factors (especially BDNF) and the selectivity in the influence of each factor by a specific comorbid disorder in cocaine addiction.

### Limitations and future perspectives

Although our findings support the importance of monitoring BDNF and IGF-1 in the context of cocaine addiction with psychiatric comorbidity, we are aware of the limitations of the present exploratory study. Firstly, the number of cases reported in our study with comorbid disorders is small and the replication is necessary. We cannot conclude whether these changes in BDNF and IGF-1 concentrations are exclusive to cocaine addiction or not because new studies in psychiatric patients with no history of drug use will be necessary to elucidate their role in mental disorders. Additional studies to determine plasma BDNF and IGF-1 in active cocaine users are necessary to confirm the lack of effects produced by the presence of cocaine on circulating concentrations of these factors. Further, longitudinal studies during cocaine abstinence could indicate whether these concentrations are unaltered or time-dependent.

The present study was conducted on outpatient subjects and, therefore we tried to show a realistic example of individuals seeking treatment in public centers for addiction but without being isolated from their social and familiar context. Nevertheless, from our results, we believe that monitoring neurotrophic factors such as BDNF and IGF-1 in cocaine users seeking treatment remains to be investigated to further improve the stratification of these patients taking into consideration the psychiatric comorbidities.

### Supporting Information

**S1 Fig. Correlation analyses between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 and variables related to addiction: length of abstinence and amount of cocaine use in abstinent cocaine users. A) BDNF (pg/mL); B) IGF-1 (ng/mL); and C) IGFBP-3 (μg/mL). Black**

dots are individual values. (r) Pearson's correlation coefficient; (rho) Spearman's correlation coefficient; (p) p-value for statistical significance.

(TIF)

**S2 Fig. Correlation analyses between plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 and total number of DSM-IV-TR criteria for cocaine abuse and dependence in abstinent cocaine users.** A) BDNF (pg/mL); B) IGF-1 (ng/mL); and C) IGFBP-3 (μg/mL). Black dots are individual values. (rho) Spearman's correlation coefficient; (p) p-value for statistical significance.

(TIF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FRF FJP. Performed the experiments: MP NG-M PA RC-C JJR PR-S AS JS EC-O FJP VB JAC JA AIM-V MAV FRF. Analyzed the data: LJS FRF FJP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT RdT LJS. Wrote the paper: FJP FRF RdT MT VB MAV. Were responsible for the study concept and design: FRF FJP. Coordinated and recruited participants from Outpatient Treatment Centers in Málaga: MP NG-M PA RC-C JJR. Contributed to the acquisition of psychiatric data by means of interviews: MP PA NG-M PR-S. Obtained and processed blood samples: AS JS EC-O FJP. Supervised the benzoyllecgonine detection and supervised the quantification of acyl derivatives in plasma: RdT. Supervised and performed the quantification of cytokines, chemokines and BDNF from human plasma: VB JAC JA. Supervised and performed the quantification of IGF-1 and IGFBP-3 from human plasma: AIM-V MAV. Assisted with data analysis and interpretation of findings: LJS FRF FJP. Drafted the manuscript: FRF FJP. Provided critical revision of the manuscript for important intellectual content: MT RdT LJS VB MAV. Critically reviewed content and approved final version for publication: All authors.

## References

1. Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol*. 2008; 154: 327–342. doi: [10.1038/bjp.2008.77](https://doi.org/10.1038/bjp.2008.77) PMID: [18345022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18345022/)
2. Haile CN, Mahoney JJ 3rd, Newton TF, De La Garza R 2nd. Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. *Pharmacol Ther*. 2012; 134: 260–277. doi: [10.1016/j.pharmthera.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.010) PMID: [22327234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22327234/)
3. Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*. 2004; 47 Suppl 1: 33–46. PMID: [15464124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15464124/)
4. Herrero MJ, Domingo-Salvany A, Torrens M, Brugal MT. Psychiatric comorbidity in young cocaine users: induced versus independent disorders. *Addiction*. 2008; 103: 284–293. doi: [10.1111/j.1360-0443.2007.02076.x](https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2007.02076.x) PMID: [18199307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199307/)
5. Reece AS. Elevated IGF1 in clinical opiate dependence. *Neuro Endocrinol Lett*. 2013; 34: 18–26. PMID: [23524620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23524620/)
6. Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavon FJ, Campos Cloute R, Calado M, et al. [Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment]. *Adicciones*. 2014; 26: 15–26. PMID: [24652395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24652395/)
7. Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R. Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry*. 2004; 161: 1231–1237. PMID: [15229056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15229056/)
8. Torrens M, Martin-Santos R, Samet S. Importance of clinical diagnoses for comorbidity studies in substance use disorders. *Neurotox Res*. 2006; 10: 253–261. PMID: [17197374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17197374/)
9. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*. 2010; 5: e9166. doi: [10.1371/journal.pone.0009166](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009166) PMID: [20161799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20161799/)

10. Sinha R. New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr Psychiatry Rep.* 2011; 13: 398–405. doi: [10.1007/s11920-011-0224-0](https://doi.org/10.1007/s11920-011-0224-0) PMID: [21792580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21792580/)
11. Domenici E, Muglia P. The search for peripheral disease markers in psychiatry by genomic and proteomic approaches. *Expert Opin Med Diagn.* 2007; 1: 235–251. doi: [10.1517/17530059.1.2.235](https://doi.org/10.1517/17530059.1.2.235) PMID: [23489310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23489310/)
12. Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, Garcia-Marchena N, et al. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 2014 May 22. doi: [10.1111/adb.12156](https://doi.org/10.1111/adb.12156)
13. Pavon FJ, Araos P, Pastor A, Calado M, Pedraz M, Campos-Cloute R, et al. Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 2013; 18: 955–969. doi: [10.1111/adb.12107](https://doi.org/10.1111/adb.12107) PMID: [24283982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24283982/)
14. Castren E. Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2004; 29: 289–302. PMID: [15181240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15181240/)
15. Corominas-Roso M, Ramos-Quiroga JA, Ribases M, Sanchez-Mora C, Palomar G, Valero S, et al. Decreased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013; 1–9. doi: [10.1017/S1461145713000746](https://doi.org/10.1017/S1461145713000746) PMID: [23953038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23953038/)
16. D'Sa C, Fox HC, Hong AK, Dileone RJ, Sinha R. Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: a prospective study. *Biol Psychiatry.* 2011; 70: 706–711. doi: [10.1016/j.biopsych.2011.05.013](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.013) PMID: [21741029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741029/)
17. Corominas-Roso M, Roncero C, Eiroa-Orosa FJ, Gonzalvo B, Grau-Lopez L, Ribases M, et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels in cocaine-dependent patients during early abstinence. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013; 23: 1078–1084. doi: [10.1016/j.euroneuro.2012.08.016](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.08.016) PMID: [23021567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23021567/)
18. Corominas-Roso M, Roncero C, Eiroa-Orosa FJ, Ribases M, Barral C, Daigre C, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels and cocaine-induced transient psychotic symptoms. *Neuropsychobiology.* 2013; 68: 146–155. doi: [10.1159/000353259](https://doi.org/10.1159/000353259) PMID: [24051573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24051573/)
19. O'Kusky J, Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol.* 2012; 33: 230–251. doi: [10.1016/j.yfrne.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.06.002) PMID: [22710100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22710100/)
20. Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol.* 2010; 70: 384–396. doi: [10.1002/dneu.20778](https://doi.org/10.1002/dneu.20778) PMID: [20186710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20186710/)
21. Malberg JE, Platt B, Rizzo SJ, Ring RH, Lucki I, Schechter LE, et al. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32: 2360–2368. PMID: [17342171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17342171/)
22. Trueba-Saiz A, Cavada C, Fernandez AM, Leon T, Gonzalez DA, Fortea Ormaechea J, et al. Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl Psychiatry.* 2013; 3: e330. doi: [10.1038/tp.2013.102](https://doi.org/10.1038/tp.2013.102) PMID: [24301648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24301648/)
23. Lin F, Suhr J, Diebold S, Heffner KL. Associations between depressive symptoms and memory deficits vary as a function of insulin-like growth factor (IGF-1) levels in healthy older adults. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 42: 118–123. doi: [10.1016/j.psyneuen.2014.01.006](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.006) PMID: [24636508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24636508/)
24. Stouthart PJ, Deijen JB, Roffel M, Delemarre-van de Waal HA. Quality of life of growth hormone (GH) deficient young adults during discontinuation and restart of GH therapy. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28: 612–626. PMID: [12727130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12727130/)
25. Leggio L, Ferrulli A, Malandrino N, Miceli A, Capristo E, Gasbarrini G, et al. Insulin but not insulin growth factor-1 correlates with craving in currently drinking alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008; 32: 450–458. doi: [10.1111/j.1530-0277.2007.00589.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00589.x) PMID: [18215216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18215216/)
26. Hasin DS, Trautman KD, Miele GM, Samet S, Smith M, Endicott J. Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry.* 1996; 153: 1195–1201. PMID: [8780425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8780425/)
27. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, et al. The Composite International Diagnostic Interview—an Epidemiologic Instrument Suitable for Use in Conjunction with Different Diagnostic Systems and in Different Cultures. *Archives of General Psychiatry.* 1988; 45: 1069–1077. PMID: [2848472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2848472/)
28. Hasin D, Samet S, Nunes E, Meydan J, Matseoane K, Waxman R. Diagnosis of comorbid psychiatric disorders in substance users assessed with the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders for DSM-IV. *Am J Psychiatry.* 2006; 163: 689–696. PMID: [16585445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16585445/)



29. Morgello S, Holzer CE 3rd, Ryan E, Young C, Naseer M, Castellon SA, et al. Interrater reliability of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS Tissue Consortium. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2006; 15: 131–138. PMID: [17019897](#)
30. Hasin DS, Fenton MC, Beseler C, Park JY, Wall MM. Analyses related to the development of DSM-5 criteria for substance use related disorders: 2. Proposed DSM-5 criteria for alcohol, cannabis, cocaine and heroin disorders in 663 substance abuse patients. *Drug Alcohol Depend*. 2012; 122: 28–37. doi: [10.1016/j.drugalcdep.2011.09.005](#) PMID: [21963333](#)
31. Hasin DS, O'Brien CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, Budney A, et al. DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *Am J Psychiatry*. 2013; 170: 834–851. doi: [10.1176/appi.ajp.2013.12060782](#) PMID: [23903334](#)
32. Rivera P, Luque-Rojas MJ, Pastor A, Blanco E, Pavon FJ, Serrano A, et al. Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *Eur J Neurosci*. 2013; 37: 105–117. doi: [10.1111/ejn.12012](#) PMID: [23033907](#)
33. Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, et al. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci Transl Med*. 2011; 3: 70ra13. doi: [10.1126/scitranslmed.3001845](#) PMID: [21325617](#)
34. Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, et al. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell*. 2009; 8: 460–472. doi: [10.1111/j.1474-9726.2009.00493.x](#) PMID: [19489743](#)
35. van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell*. 2005; 4: 79–85. PMID: [15771611](#)
36. Viola TW, Tractenberg SG, Levandowski ML, Pezzi JC, Bauer ME, Teixeira AL, et al. Neurotrophic factors in women with crack cocaine dependence during early abstinence: the role of early life stress. *J Psychiatry Neurosci*. 2014; 39: 206–214. PMID: [24331739](#)
37. Sordi AO, Pechansky F, Kessler FH, Kapczinski F, Pfaffenseller B, Gubert C, et al. Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014; 231:4031–4039. doi: [10.1007/s00213-014-3542-1](#) PMID: [24676990](#)
38. von Diemen L, Kapczinski F, Sordi AO, de Magalhães Narvaez JC, Guimaraes LS, Kessler FH, et al. Increase in brain-derived neurotrophic factor expression in early crack cocaine withdrawal. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014; 17: 33–40. doi: [10.1017/S146114571300103X](#) PMID: [24067327](#)
39. Bao Q, Pan J, Qi H, Wang L, Qian H, Jiang F, et al. Aging and age-related diseases—From endocrine therapy to target therapy. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 394: 115–118. doi: [10.1016/j.mce.2014.07.005](#) PMID: [25038521](#)
40. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol*. 2013; 9: 366–376. doi: [10.1038/nrendo.2013.67](#) PMID: [23591370](#)
41. Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Aleman I. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci*. 2012; 49: 9–12. doi: [10.1016/j.mcn.2011.07.008](#) PMID: [21807098](#)
42. Aleman A, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog Neurobiol*. 2009; 89: 256–265. doi: [10.1016/j.pneurobio.2009.07.008](#) PMID: [19665513](#)
43. Hashiguchi Y, Molina PE, Fan J, Lang CH, Abumrad NN. Central opiate modulation of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Brain Res Bull*. 1996; 40: 99–104. PMID: [8724426](#)
44. Beitner-Johnson D, Nestler EJ. Chronic morphine decreases insulin-like growth factor-I levels in the ventral tegmental area of the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 692: 246–248. PMID: [8215026](#)
45. Garcia-Valdecasas-Campelo E, Gonzalez-Reimers E, Santolara-Fernandez F, De La Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sanchez-Perez MJ, et al. Brain atrophy in alcoholics: relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation. *Alcohol Alcohol*. 2007; 42: 533–538. PMID: [17855333](#)
46. Han C, Bae H, Kim DJ, Bae JY, Oh SI. Or12–2the relationship between insulin-like growth factor-1 and cognitive function in alcohol-dependent patient. *Alcohol Alcohol*. 2014; 49 Suppl 1: i49.
47. Hall K, Hilding A, Thoren M. Determinants of circulating insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol Invest*. 1999; 22: 48–57. PMID: [10442571](#)
48. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11: 1169–1180. doi: [10.1017/S1461145708009309](#) PMID: [18752720](#)

49. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry*. 2010; 11: 763–773. doi: [10.3109/15622971003611319](https://doi.org/10.3109/15622971003611319) PMID: [20334574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20334574/)
50. Piccinni A, Marazziti D, Catena M, Domenici L, Del Debbio A, Bianchi C, et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *J Affect Disord*. 2008; 105: 279–283. PMID: [17553570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17553570/)
51. Kim YK, Lee HP, Won SD, Park EY, Lee HY, Lee BH, et al. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 78–85. PMID: [16904252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904252/)
52. Rosa AR, Singh N, Whitaker E, de Brito M, Lewis AM, Vieta E, et al. Altered plasma glutathione levels in bipolar disorder indicates higher oxidative stress; a possible risk factor for illness onset despite normal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Psychol Med*. 2014; 1–10.
53. Kenna HA, Reynolds-May M, Stepanenko A, Ketter TA, Hallmayer J, Rasgon NL. Blood levels of brain derived neurotrophic factor in women with bipolar disorder and healthy control women. *J Affect Disord*. 2014; 156: 214–218. doi: [10.1016/j.jad.2013.01.054](https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.01.054) PMID: [24398043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24398043/)
54. Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*. 2007; 10: 1089–1093. PMID: [17726474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17726474/)
55. Dalle Molle R, Portella AK, Goldani MZ, Kapczinski FP, Leistner-Segal S, Salum GA, et al. Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl Psychiatry*. 2012; 2: e195. doi: [10.1038/tp.2012.126](https://doi.org/10.1038/tp.2012.126) PMID: [23168995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23168995/)
56. Suliman S, Hemmings SM, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci*. 2013; 7: 55. doi: [10.3389/fnint.2013.00055](https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00055) PMID: [23908608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908608/)
57. Deuschle M, Blum WF, Strasburger CJ, Schweiger U, Weber B, Körner A, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) plasma concentrations are increased in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*. 1997; 22: 493–503. PMID: [9373883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9373883/)
58. Liu X, Zhang T, He S, Hong B, Chen Z, Peng D, et al. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2014; 218: 54–60. doi: [10.1016/j.psychres.2014.03.042](https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.03.042) PMID: [24793757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24793757/)



# Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings

**María Pedraz<sup>1†</sup>, Pedro Araos<sup>1†</sup>, Nuria García-Marchena<sup>1†</sup>, Antonia Serrano<sup>1</sup>, Pablo Romero-Sanchiz<sup>1</sup>, Juan Suárez<sup>1</sup>, Estela Castilla-Ortega<sup>1</sup>, Fermín Mayoral-Cleries<sup>1</sup>, Juan Jesús Ruiz<sup>2</sup>, Antoni Pastor<sup>3,4</sup>, Vicente Barrios<sup>5,6</sup>, Julie A. Chowen<sup>5,6</sup>, Jesús Argente<sup>5,6</sup>, Marta Torrens<sup>3,4,7</sup>, Rafael de la Torre<sup>3,6,8</sup>, Fernando Rodríguez De Fonseca<sup>1,6\*</sup> and Francisco Javier Pavón<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unidad Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>2</sup> Centro Provincial de Drogodependencia, Diputación de Málaga, Málaga, Spain

<sup>3</sup> Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Department of Pediatrics and Pediatric Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>6</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>7</sup> Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) del Parc de Salut MAR, Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Barcelona, Spain

## Edited by:

Miriam Melis, University of Cagliari, Italy

## Reviewed by:

Chamindi Seneviratne, University of Maryland, USA

Martin Zack, Centre for Addiction and Mental Health, Canada

## \*Correspondence:

Fernando Rodríguez De Fonseca and Francisco Javier Pavón, Laboratorio de Medicina Regenerativa-IBIMA, Hospital R. U. de Málaga, Pabellón de Gobierno sótano, Málaga 29010, Spain  
e-mail: fernando.rodriguez@ibima.eu; javier.pavon@ibima.eu

<sup>†</sup> María Pedraz, Pedro Araos and Nuria García-Marchena have contributed equally to this work.

There are sex differences in the progression of drug addiction, relapse, and response to therapies. Because biological factors participate in these differences, they should be considered when using biomarkers for addiction. In the current study, we evaluated the sex differences in psychiatric comorbidity and the concentrations of plasma mediators that have been reported to be affected by cocaine. Fifty-five abstinent cocaine-addicted subjects diagnosed with lifetime cocaine use disorders (40 men and 15 women) and 73 healthy controls (48 men and 25 women) were clinically assessed with the diagnostic interview "Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders." Plasma concentrations of chemokines, cytokines, *N*-acyl-ethanolamines, and 2-acyl-glycerols were analyzed according to history of cocaine addiction and sex, controlling for covariates age and body mass index (BMI). Relationships between these concentrations and variables related to cocaine addiction were also analyzed in addicted subjects. The results showed that the concentrations of chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1) and chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1 (CXCL12/SDF-1) were only affected by history of cocaine addiction. The plasma concentrations of interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) were affected by history of cocaine addiction and sex. In fact, whereas cytokine concentrations were higher in control women relative to men, these concentrations were reduced in cocaine-addicted women without changes in addicted men. Regarding fatty acid derivatives, history of cocaine addiction had a main effect on the concentration of each acyl derivative, whereas *N*-acyl-ethanolamines were increased overall in the cocaine group, 2-acyl-glycerols were decreased. Interestingly, *N*-palmitoleoyl-ethanolamine (POEA) was only increased in cocaine-addicted women. The covariate BMI had a significant effect on POEA and *N*-arachidonoyl-ethanolamine concentrations. Regarding psychiatric comorbidity in the cocaine group, women had lower incidence rates of comorbid substance use disorders than did men. For example, alcohol use disorders were found in 80% of men and 40% of women. In contrast, the addicted women had increased prevalences of comorbid psychiatric disorders (i.e., mood, anxiety, and psychosis disorders). Additionally, cocaine-addicted subjects showed a relationship between the concentrations of *N*-stearoyl-ethanolamine and 2-linoleoyl-glycerol and diagnosis of psychiatric comorbidity. These results demonstrate the existence of a sex influence on plasma biomarkers for cocaine addiction and on the presence of comorbid psychopathologies for clinical purposes.

**Keywords:** cocaine use disorders, psychiatric comorbidity, cytokine, endocannabinoid, sex, outpatient, biomarker, abstinence



## INTRODUCTION

Over the last 10 years, cocaine has established itself as the most commonly used illicit stimulant drug in Europe, although most users are found in a small number of high-prevalence countries. Cocaine use is particularly high in Spain, with a lifetime prevalence of 10.2% in the general population, and it represents a significant public health concern (1).

There are several factors that influence the acquisition, maintenance, and progression to addiction, such as social context, age, genetic characteristics, and sex (2). In this respect, sex differences have been found in cocaine use and addiction, including cocaine use initiation, progression to abuse and dependence, relapse following abstinence, and responsiveness to treatment (3–5).

Epidemiological data suggest that women have a rapid escalation in drug use and progress more quickly to cocaine addiction compared with men (6). Women are more sensitive to social stressors, and abstinent cocaine-addicted women report higher levels of craving in response to cocaine-related cues (7, 8). Sex also influences treatments and relapses because women report shorter abstinence periods and higher relapse rates after stressful or depressive events (9). All of these observations parallel preclinical animal models using rodents showing that females are more vulnerable to the abuse-related effects of cocaine than males (10).

Despite evidence that women are more vulnerable than men to cocaine addiction, the rates of cocaine use are currently higher in men than in women, and the proportion of cocaine users seeking treatment in outpatient cocaine programs is approximately five men to every woman in Europe (1). Considering that cocaine addiction is commonly associated with altered executive functions, impaired emotional processing capacity, and elevated incidence of comorbid mental disorders (11, 12), sex is a primary factor underlying these behavioral complications. In fact, sex differences in psychopathologies and substance use disorders have been linked to the activity of hormones (i.e., gonadal steroid hormones), menstrual cycle, HPA axis reactivity, and neurobiological factors (13–15).

Recently, the search for biomarkers for psychiatric disorders and addiction has generated a number of putative biomarkers that includes circulating mediators with neuromodulatory functions (16–18). Among these molecules, inflammatory proteins and fatty acid derivatives have been reported to be altered in abstinent cocaine-addicted subjects (19, 20). Moreover, changes in plasma cytokine and chemokine concentrations have been shown to be related to the pathological cocaine use and cocaine symptom severity (20), whereas changes in endocannabinoids and congeners are related to cocaine use disorders and psychiatric comorbidity (19). However, the influence of sex was not directly studied in these reports.

Because previous studies have reported sex differences in all phases related to the progression to cocaine addiction and because gonadal hormones can affect other signaling systems sensitive to cocaine addiction, those molecules identified as putative biomarkers for cocaine addiction and common psychiatric comorbidity may be influenced by sex.

The primary purpose of the present observational study was to examine the plasma concentrations of chemokines, cytokines, and fatty acid derivatives in a cohort of abstinent cocaine-addicted subjects on an outpatient basis according to their sex. Additionally, the prevalences of comorbidity of other substance and mental disorders were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### SUBJECTS AND RECRUITMENT

All participants were white Caucasians grouped into abstinent cocaine users and healthy controls. Fifty-nine cocaine users (17 women and 42 men) were initially enrolled from outpatient treatment programs for cocaine addiction in the province of Málaga (Spain) for a 24-month period (2011–2013). Seventy-six healthy individuals (25 women and 51 men) were recruited from a multidisciplinary staff working at the Hospital Regional Universitario de Málaga.

Cocaine users had to meet eligibility criteria based on inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria were as follows:  $\geq 18$ –65 years of age, intranasal cocaine use, diagnosis of lifetime cocaine use disorders, and abstinence from cocaine for at least 2 weeks before testing (urine and plasma analyses). Exclusion criteria were as follows: personal history of chronic diseases (e.g., cardiovascular, respiratory, renal, hepatic, neurological, or endocrine diseases), personal history of cancer, infectious diseases, incapacitating cognitive alterations, and pregnancy.

Controls were matched with the cocaine group for sex ratio, age, and body mass index (BMI). In addition to the mentioned exclusion criteria for abstinent cocaine users, controls were excluded if they had a personal history of drug abuse or lifetime psychiatric disorders. All women were recruited without considering their menstrual cycle.

Finally, 55 abstinent cocaine-addicted subjects (15 women and 40 men) and 63 controls (25 women and 48 men) met the eligibility criteria and completed the study.

All cocaine-addicted subjects were under current treatment interventions, including pharmacological and behavioral approaches. Regarding the pharmacological interventions, 20 participants (12 men and 8 women) were treated with anxiolytics ( $n = 9$ ), antipsychotics ( $n = 2$ ), antidepressants ( $n = 8$ ), and disulfiram ( $n = 1$ ).

### CLINICAL ASSESSMENTS

Cocaine users were evaluated according to “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition-Text Revision” (DSM-IV-TR) criteria, using the Spanish version of the “Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders” (PRISM) (21, 22). Controls were evaluated by PRISM (for substance screening and abuse and dependence) and the Spanish version of the “Composite International Diagnostic Interview” (CIDI) to detect psychiatric disorders (23). All interviews were

**Abbreviations:** 2-AG, 2-arachidonoyl-glycerol; 2-LG, 2-linoleoyl-glycerol; AEA, *N*-arachidonoyl-ethanolamine; CCL2/MCP-1, chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1; CXCL12/SDF-1, chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1; CX3CL1/fractalkine, chemokine (C-X<sub>3</sub>-C motif) ligand 1/fractalkine; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; LEA, *N*-linoleoyl-ethanolamine; OEA, *N*-oleoyl-ethanolamine; PEA, *N*-palmitoyl-ethanolamine; POEA, *N*-palmitoleoyl-ethanolamine; SEA, *N*-stearoyl-ethanolamine; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

performed by experienced psychologists who had received both PRISM and CIDI training. Two cocaine users did not meet the criteria for cocaine use disorders and three controls were diagnosed with lifetime mental disorders (major depression and anxiety). They were consequently excluded from the study.

### **Psychiatric research interview for substance and mental disorders (PRISM)**

The PRISM is a semistructured interview to diagnose psychiatric disorders among substance users (22, 24, 25). Diagnoses were made using two time-frames: “current” (criteria were met within the past year) and “past” (criteria were met before the previous 12 months). Lifetime prevalence was used to present the frequency of substance use disorders, non-substance use disorders, and psychiatric comorbidity. The cocaine symptom severity was assessed combining the DSM-IV-TR criteria for cocaine use disorders: 7 dependence criteria (for a diagnosis of dependence, 3 or more co-occurring symptoms in a 12-month period are required) and 4 abuse criteria (1 symptom is necessary for a diagnosis of abuse) (19, 20).

### **LABORATORY METHODS FOR HUMAN SAMPLES**

#### **Collection and analysis of plasma samples**

Blood samples were obtained in the morning (09:00–11:00 a.m.) after fasting for 8–12 h (previous to the psychiatric interviews). Venous blood was collected into 10 mL K<sub>2</sub>-EDTA tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and processed to obtain plasma. Blood samples were centrifuged at 2,200 × *g* for 15 min (4°C), and plasma was analyzed for HIV and hepatitis types B and C.

**Analysis for HIV and hepatitis types B and C.** Plasmas samples were individually assayed by three rapid tests for detecting HIV (Retroscreen HIV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd., Goa, India), hepatitis B (HBsAg Test, Toyo Diagnostics-TurkLab Inc., Izmir, Turkey), and hepatitis C (Flaviscreeen HCV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd., Goa, India). No samples that tested positive were detected. Plasma samples were stored at –80°C until further analyses.

**Analysis for the cocaine metabolite benzoylecgonine.** Plasma analyses for cocaine metabolites (Benzoylecgonine Specific Direct ELISA Kit Immunalysis, Pomona, CA, USA) were performed to confirm cocaine abstinence. Two cocaine users who tested negative for drugs of abuse in urine analyses at the outpatient treatment centers for cocaine addiction were positive for benzoylecgonine in plasma, and they were excluded from this study.

#### **Multiplex immunoassay analysis**

A Bio-Plex Suspension Array System 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to quantify the plasma concentrations of inflammatory cytokines and chemokines following the manufacturer’s instructions as previously reported (20). Human protein panels were used to simultaneously detect the following analytes: tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ); interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); interleukin-6 (IL-6); interleukin-10 (IL-10); chemokine (C-X<sub>3</sub>-C motif) ligand 1 [CX3CL1], commonly referred to as fractalkine; chemokine (C-C motif) ligand 2 [CCL2], also referred

to as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); and chemokine (C-X-C motif) ligand 12 [CXCL12], also referred to as stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). Raw data (mean fluorescence intensity) were analyzed using the Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Data of plasma concentrations were in pg of protein per mL of plasma.

#### **Quantification of fatty acid derivatives**

The following fatty acid derivatives and their respective deuterated forms were used for quantification: *N*-stearoyl-ethanolamine (SEA), *N*-palmitoyl-ethanolamine (PEA) and PEA-d<sub>4</sub>, *N*-oleoyl-ethanolamine (OEA) and OEA-d<sub>4</sub>, *N*-palmitoleoyl-ethanolamine (POEA), *N*-arachidonoyl-ethanolamine (AEA) and AEA-d<sub>4</sub>, *N*-linoleoyl-ethanolamine (LEA) and LEA-d<sub>4</sub>, 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) and 2-AG-d<sub>5</sub>, and 2-linoleoyl-glycerol (2-LG). PEA-d<sub>4</sub> and OEA-d<sub>4</sub> were used for the quantification of POEA and SEA, respectively, because their deuterated forms were not commercially available. All reagents were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Sample extraction and chromatographic separation were performed in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) as previously reported (19, 26). Data of plasma concentrations were in ng of acyl derivative per mL of plasma.

#### **ETHICS STATEMENT**

Written informed consent was obtained from each subject after they had received a complete description of the present study and had been given the chance to discuss any questions or issues. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the Hospital Regional Universitario de Málaga (07/19/2009 PND049/2009 and P10228-2013; CEI Provincial de Málaga) and were therefore conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (seventh revision in 2013, Fortaleza, Brazil).

#### **STATISTICAL ANALYSES**

All data for graphs and tables are expressed as number and percentage of subjects [*n* (%)] or the mean and standard deviation [mean (SD)]. Samples were grouped by sex and the significance of differences was assessed by Fisher’s exact test or Student’s *t*-test. The statistical analyses of plasma concentrations were performed using two-way analysis of covariance (ANCOVA) [factors: history of cocaine addiction (cocaine/control) and sex (men/women); covariates: age and BMI]. Multiple comparisons were performed with unadjusted (observed) or adjusted (estimated marginal) according to the effects of covariates. Plasma concentrations in subjects with a history of cocaine addiction were analyzed by univariate general linear models to evaluate relationships with sex, age, BMI, and group-specific variables (cocaine symptom severity, diagnosis of comorbid psychiatric disorders, and length of cocaine abstinence). A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.04 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and IBM SPSS Statistical version 22 software (IBM, Armonk, NY, USA).

## RESULTS

### SOCIAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS

A total of 128 subjects met the eligibility criteria for this study and were grouped into the cocaine ( $n = 55$ ) and control ( $n = 73$ ) groups. Both groups were divided into men and women. A description of the sample is presented in **Table 1**.

Men seeking treatment for cocaine addiction were more common than women, at a ratio of one woman to eight men in the centers for cocaine addiction where the recruitment was conducted (data not shown). During a 24-month period (January 2011–December 2012), 20 women were contacted to participate in this study; 17 accepted and were diagnosed with lifetime cocaine use disorders. Finally, 15 cocaine-addicted women completed the study. Whereas the abstinent cocaine-addicted men had a mean age of 37 years, the cocaine-addicted women were older (mean: 43 years;  $p < 0.01$ ). We observed no differences between the sexes in other socio-demographic variables in the cocaine group. Considering both sexes, the addicted subjects were married/cohabiting (47%), lived in couple (49%), had a low educational level (42% with secondary level or more), and were unemployed (58%). In contrast, the control subjects had a higher educational level (96% with secondary level or more) and employment rate (89%).

Interestingly, the cocaine-addicted subjects displayed a higher incidence in the use of psychological counseling, excluding treatments of severe/serious mental disorders, with 30% in men and 60% in women. These percentages were reduced in the control group to 8% in men and 48% in women.

### COMORBID MENTAL AND SUBSTANCE USE DISORDERS IN ABSTINENT COCAINE-ADDICTED SUBJECTS GROUPED BY SEX

#### *Comorbid substance use disorders and cocaine use-related variables*

As shown in **Table 2**, the cocaine group had an elevated prevalence of comorbid substance use disorders in addition to cocaine use disorders, primarily alcohol (69%) and cannabis (20%) use disorders. We observed sex differences in the prevalences of these other substance use disorders because they were more common in men than in women: alcohol use disorders were diagnosed in 80% of men and 40% of women ( $p < 0.01$ ), and cannabis use disorders were diagnosed in 25% of men and 7% of women.

Focusing on the variables related to cocaine use, we did not observe sex differences in the prevalences of abuse and dependence, length of cocaine abstinence, duration of cocaine use, or cocaine symptom severity. Therefore, the average cocaine-addicted subject, including men and women, displayed cocaine abstinence for 178.6 (281.7) days [mode: 120 days (range: 730)], a cumulative cocaine use of 8.2 (6.6) years [mode: 4 years (range: 31)] and 8.1 (2.5) DSM-IV criteria for cocaine use disorders.

#### *Comorbid mental disorders*

Regarding the common psychiatric disorders assessed with the PRISM, we found high prevalences of comorbid psychopathologies (60%): mood (38%), anxiety (22%), psychosis (20%), and personality (35%) disorders.

**Table 1 | Baseline socio-demographic variables in abstinent cocaine-addicted and control subjects grouped by sex.**

Variable		Cocaine group		Control group	
		Men	Women	Men	Women
Sex [ $n$ (%)]		40 (72.7)	15 (27.3)	48 (65.8)	25 (34.2)
Age ( $\geq 18$ ) [Mean (SD)]		37.1 (6.7)	42.8 (6.2)*	38.6 (9.8)	42.6 (8.4)
Body mass [Mean (SD)]	Body mass index	26.2 (4.3)	25.4 (5.9)	25.4 (5.9)	23.9 (4.7)
Current marital status [ $n$ (%)]	Never married	12 (30.0)	4 (26.7)	23 (47.9)	10 (40.0)
	Married/cohabiting	19 (47.5)	7 (46.7)	22 (45.8)	10 (40.0)
	Divorced/separated	9 (22.5)	3 (20.0)	3 (6.3)	4 (16.0)
	Widowed	0 (0.0)	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (4.0)
Living together last year [ $n$ (%)]	Friends, squatters	1 (2.5)	1 (6.7)	3 (6.3)	0 (0.0)
	Parents	14 (35.0)	5 (33.3)	9 (18.8)	7 (28.0)
	Couple	20 (50.0)	7 (46.7)	25 (52.1)	12 (48.0)
	Alone	4 (10.0)	1 (6.7)	10 (20.8)	6 (24.0)
	Others	1 (2.5)	1 (6.7)	1 (2.1)	0 (0.0)
Educational level [ $n$ (%)]	$\leq$ Primary level	24 (60.0)	8 (53.3)	3 (6.3)	0 (0.0)
	$\geq$ Secondary level	16 (40.0)	7 (46.7)	45 (93.8)	25 (100.0)
Work status [ $n$ (%)]	Employed	16 (40.0)	4 (26.7)	42 (87.5)	23 (92.0)
	Unemployed	22 (55.0)	10 (66)	5 (10.4)	2 (8.0)
	Retired/disabled	2 (5.0)	1 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Student	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.1)	0 (0.0)
Use of psychological resources [ $n$ (%)]	No	28 (70.0)	6 (40.0)	44 (91.7)	13 (52.0)
	Yes	12 (30.0)	9 (60.0)	4 (8.3)	12 (48.0)

\* $p < 0.05$  denotes significant differences between cocaine-addicted men and women.

**Table 2 | Cocaine use-related variables in abstinent cocaine-addicted subjects grouped by sex.**

Variable		Cocaine group		p-Value
		Men (n = 40)	Women (n = 15)	
Lifetime substance use disorders [n (%)]	Cocaine use disorders	40 (100.0)	15 (100.0)	ns
	Alcohol use disorders	32 (80.0)	6 (40.0)	<b>0.008</b>
	Cannabis use disorders	10 (25.0)	1 (6.7)	ns
	Other substance use disorders	9 (22.5)	2 (13.3)	ns
Lifetime cocaine use disorders [n (%)]	Cocaine abuse	35 (87.5)	14 (93.3)	ns
	Cocaine dependence	36 (90.0)	13 (86.7)	ns
	Cocaine abuse and dependence	31 (77.5)	12 (80.0)	ns
Cocaine abstinence [Mean (SD)]	Days	184.2 (323.2)	163.7 (145.2)	ns
Cocaine use [Mean (SD)]	Years	8.0 (6.8)	9.6 (6.5)	ns
DSM-IV criteria for cocaine use disorders [Mean (SD)]	Counts	8.1 (2.5)	7.9 (1.9)	ns

ns, non-significant.

Bold indicates statistically significant p-values.

**Table 3 | Psychiatric comorbidity in abstinent cocaine-addicted subjects grouped by sex.**

Variable		Cocaine group		p-value
		Men (n = 40)	Women (n = 15)	
Lifetime psychiatric disorders <sup>a</sup> [n (%)]	No	18 (45.0)	4 (26.7)	ns
	Mood disorders	13 (32.5)	8 (53.3)	ns
	Anxiety disorders	5 (12.5)	7 (46.7)	<b>0.011</b>
	Psychosis disorders	6 (15.0)	5 (33.3)	ns
	Eating disorders	0 (0.0)	0 (0.0)	–
	Personality disorders	14 (35.0)	5 (33.3)	ns
Mood disorders [n (%)]	Primary	6 (15.0)	2 (13.3)	ns
	Cocaine-induced	7 (17.5)	5 (33.3)	
	Primary and cocaine-induced	0 (0.0)	1 (6.7)	
Anxiety disorders [n (%)]	Primary	2 (5.0)	3 (20.0)	ns
	Cocaine-induced	3 (7.5)	2 (13.3)	
	Primary and cocaine-induced	0 (0.0)	2 (6.7)	
Psychosis disorders [n (%)]	Primary	0 (0.0)	0 (0.0)	ns
	Cocaine-induced	6 (15.0)	5 (33.3)	
	Primary and cocaine-induced	0 (0.0)	0 (0.0)	
Personality disorders [n (%)]	Borderline	6 (15.0)	3 (20.0)	ns
	Antisocial	6 (15.0)	1 (6.7)	
	Borderline and antisocial	2 (5.0)	1 (6.7)	

<sup>a</sup>Psychiatric disorders diagnosed with PRISM.

ns, non-significant.

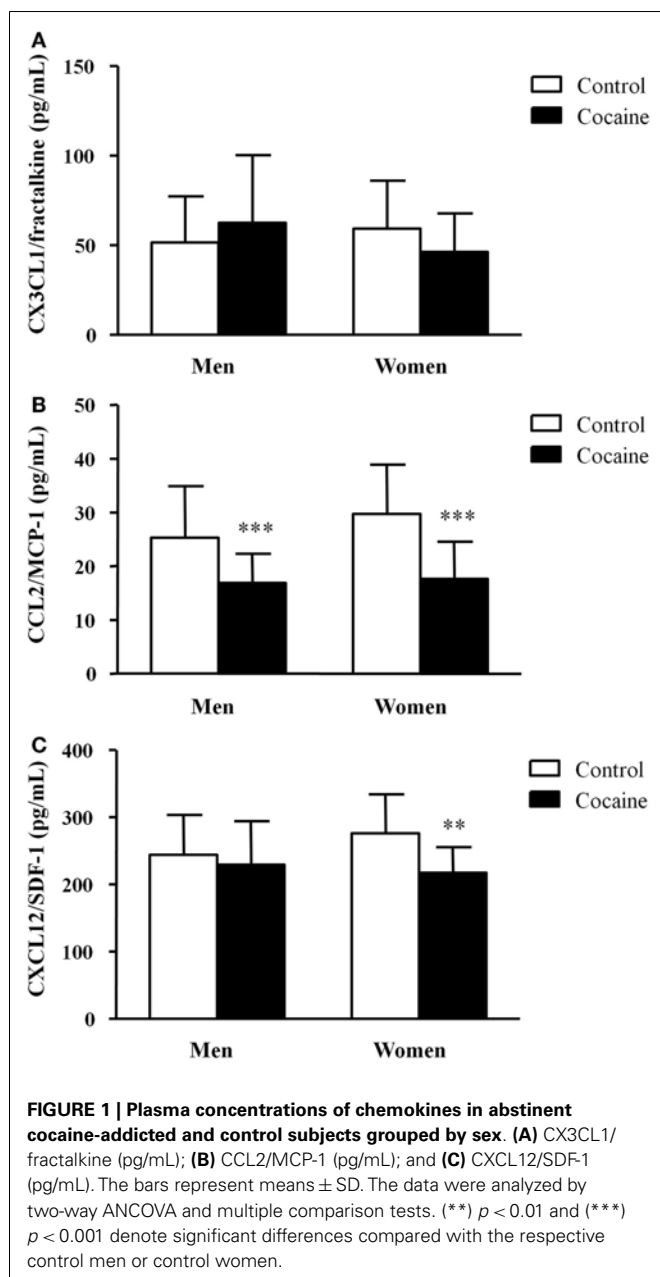
Bold indicates statistically significant p-values.

According to sex, cocaine-addicted women showed higher prevalences of mood, anxiety ( $p < 0.05$ ), and psychosis disorders compared with cocaine-addicted men (Table 3). Though some women were diagnosed with both primary and cocaine-induced disorders for mood and anxiety disorders, no men were diagnosed with primary and cocaine-induced disorders (the two together). However, these psychiatric prevalences were not significantly different between men and women, although there was a limitation in the sample size considered.

Regarding personality disorders, we observed no differences between the sexes.

#### PLASMA CONCENTRATIONS OF CHEMOKINES ACCORDING TO HISTORY OF COCAINE ADDICTION AND SEX

The mean plasma concentrations of CX3CL1/fractalkine, CCL2/MCP-1, and CXCL12/SDF-1 in the cocaine and control groups are shown in Figure 1. Two-way ANCOVAs were performed to analyze the chemokine concentrations. Covariates age and BMI were



included in the analyses but there was not a significant effect of the covariates on either chemokine concentrations.

We did not observe main effects of history of cocaine addiction and sex on plasma CX3CL1 concentrations, but there was a significant interaction effect ( $F_{1,122} = 4.60$ ,  $p = 0.034$ ) (Figure 1A). However, the plasma concentrations of CCL2 were significantly affected by history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 42.03$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1B). The multiple comparisons showed that cocaine-addicted men and women had significantly decreased CCL2 concentrations ( $***p < 0.001$ ) compared with their respective controls. Similarly, history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 7.72$ ,  $p = 0.006$ ) had a significant main effect on CXCL12 concentrations (Figure 1C). In this case, we detected a significant decrease

in cocaine-addicted women ( $**p < 0.01$ ) compared with control women, but this difference was not found in men.

Therefore, sex had no significant primary effect on chemokine concentrations.

#### PLASMA CONCENTRATIONS OF CYTOKINES ACCORDING TO HISTORY OF COCAINE ADDICTION AND SEX

The plasma concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  in the cocaine and control groups are illustrated in Figure 2. Again, there was not a significant relationship between the covariates and cytokine concentrations.

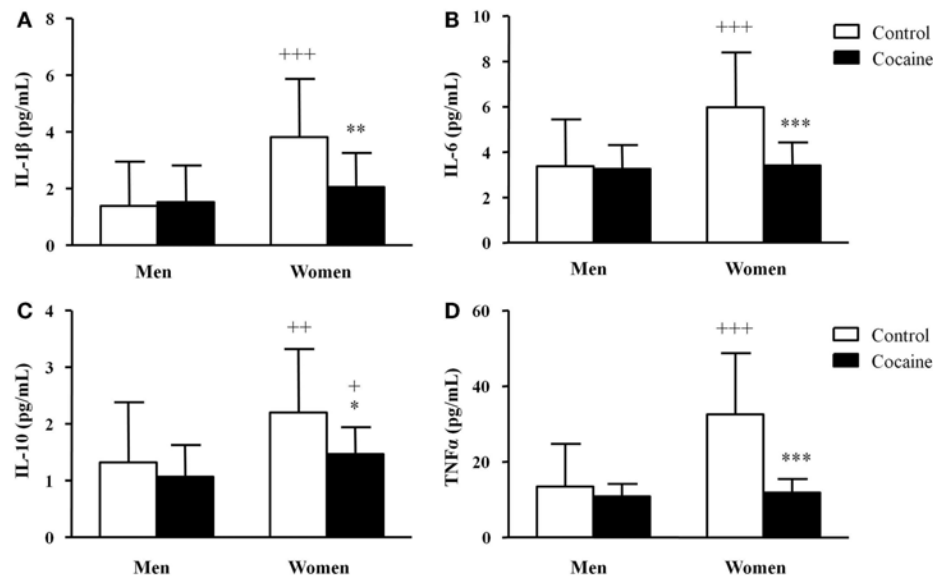
As shown in Figure 2A, the IL-1 $\beta$  concentrations were significantly affected by history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 5.73$ ,  $p = 0.018$ ) and by sex ( $F_{1,122} = 20.41$ ,  $p < 0.001$ ). An interaction between history of cocaine addiction and sex was also detected ( $F_{1,122} = 8.36$ ,  $p = 0.005$ ). The paired comparisons revealed that control women had significantly increased IL-1 $\beta$  concentrations ( $+ + + p < 0.001$ ) compared with control men ( $3.81 \pm 2.06$  and  $1.40 \pm 1.55$  pg/mL, respectively). However, cocaine-addicted women had a significant decrease in the IL-1 $\beta$  concentrations ( $**p < 0.01$ ) relative to control women but exhibited no differences compared with cocaine-addicted men.

The IL-6 concentrations (Figure 2B) were also significantly affected by history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 13.46$ ,  $p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,122} = 11.05$ ,  $p = 0.001$ ). Additionally, there was a significant interaction between the factors ( $F_{1,122} = 13.35$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, although control women had higher IL-6 concentrations ( $+ + + p < 0.001$ ) than did control men ( $5.98 \pm 2.41$  and  $3.37 \pm 2.08$  pg/mL, respectively), the IL-6 concentrations in cocaine-addicted women were significantly lower ( $***p < 0.001$ ) than in control women.

In relation to IL-10 (Figure 2C), history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 8.69$ ,  $p = 0.004$ ) and sex ( $F_{1,122} = 11.14$ ,  $p = 0.001$ ) had a significant primary effect on the IL-10 concentrations. There was an interaction between the factors ( $F_{1,122} = 25.63$ ,  $p < 0.001$ ). Considering the *post hoc* comparisons, control women had increased IL-10 concentrations ( $+ + p < 0.01$ ) relative to control men ( $2.20 \pm 1.12$  and  $1.32 \pm 1.06$  pg/mL, respectively). In addition, cocaine-addicted women exhibited a significant decrease in IL-1 $\beta$  concentrations ( $*p < 0.05$ ) compared with control women, but cocaine-addicted women had higher concentrations ( $+ p < 0.05$ ) than did cocaine-addicted men.

Finally, the statistical analysis of TNF $\alpha$  concentrations (Figure 2D) revealed a significant main effect of history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 34.98$ ,  $p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,122} = 20.90$ ,  $p < 0.001$ ) after adjusting for covariates. There was an interaction between history of cocaine addiction and sex ( $F_{1,122} = 22.46$ ,  $p < 0.001$ ). Once again, control women had higher TNF $\alpha$  concentrations ( $+ + + p < 0.001$ ) than did control men ( $32.55 \pm 16.21$  and  $13.47 \pm 11.28$  pg/mL, respectively). Cocaine-addicted women showed a significant decrease in TNF $\alpha$  concentrations ( $***p < 0.001$ ) compared with control women, but no differences compared with cocaine-addicted men.

Therefore, we observed higher cytokine concentrations in women than in men. Moreover, a specific and dramatic decrease in cytokine concentrations was observed in cocaine-addicted women but not in cocaine-addicted men.



**FIGURE 2 | Plasma concentrations of cytokines in abstinent cocaine-addicted and control subjects grouped by sex. (A)** IL-1 $\beta$  (pg/mL); **(B)** IL-6 (pg/mL); **(C)** IL-10 (pg/mL); and **(D)** TNF $\alpha$  (pg/mL). The bars represent means  $\pm$  SD. The data were analyzed by two-way ANCOVA and multiple

comparison tests. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , and (\*\*\*)  $p < 0.001$  denote significant differences compared with control women. (+)  $p < 0.05$ , (++)  $p < 0.01$ , and (+++)  $p < 0.001$  denote significant differences compared with the respective control men or cocaine-addicted men.

## PLASMA CONCENTRATIONS OF FATTY ACID DERIVATIVES ACCORDING TO HISTORY OF COCAINE ADDICTION AND SEX

The plasma concentrations of fatty acid derivatives were grouped into the following categories: (i) saturated (SEA and PEA), monounsaturated (POEA and OEA), and polyunsaturated (AEA and LEA) *N*-acyl-ethanolamines (Figure 3) and (ii) 2-acylglycerols (2-AG and 2-LG) (Figure 4). Significant relationships between the covariates (age and BMI) and these fatty acid derivative concentrations were detected by the statistical analysis.

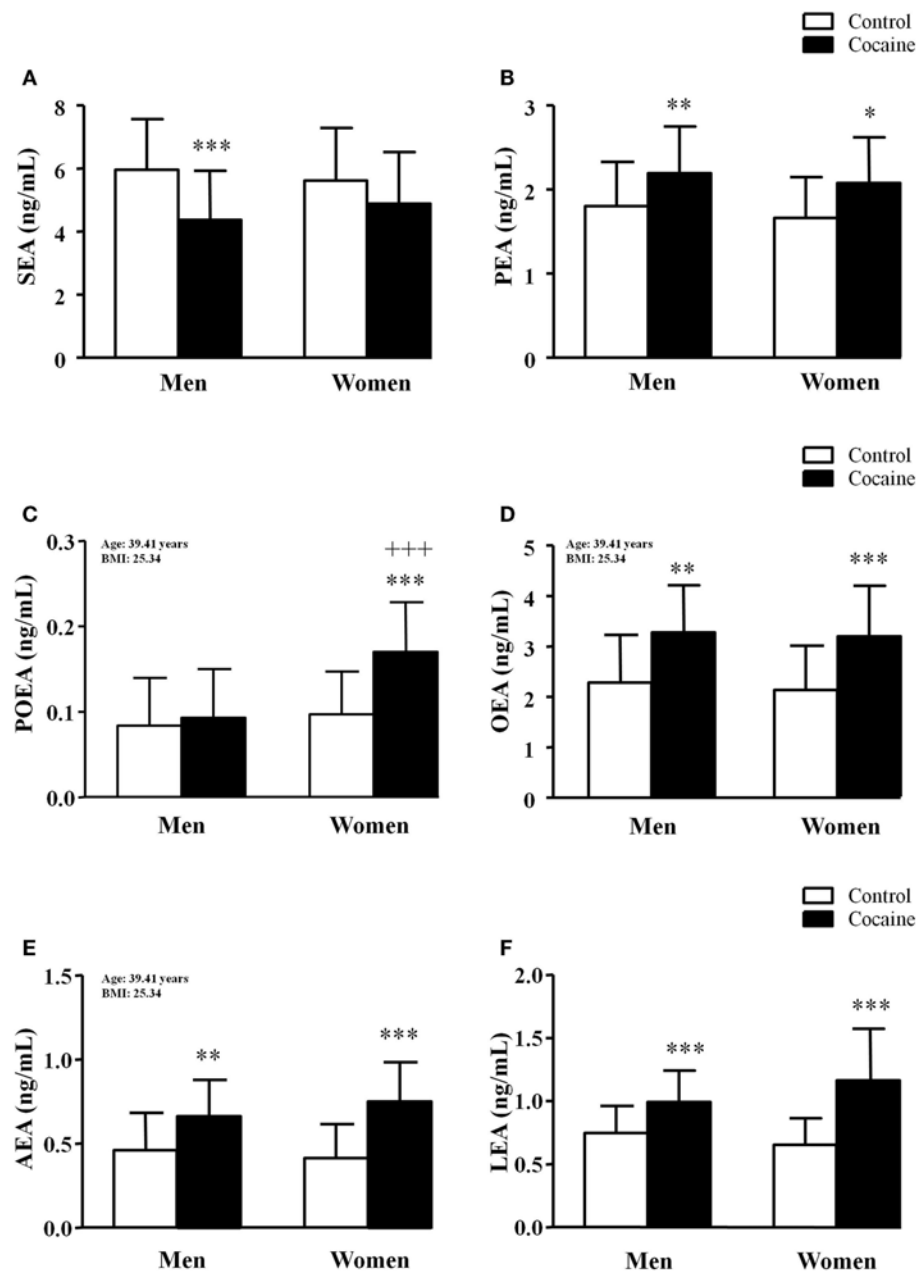
### *N*-acyl-ethanolamines

History of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 11.09$ ,  $p = 0.001$ ) had a significant main effect on plasma SEA concentrations, but sex had no effect (Figure 3A). There was not a significant effect of the covariates on SEA concentrations, and the *post hoc* tests using unadjusted means only indicated a significant decrease in the cocaine-addicted men (\*\*\*) compared with the control men. Regarding the other saturated lipid derivative (Figure 3B), plasma PEA concentrations were also significantly affected by history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 11.04$ ,  $p = 0.001$ ) without effect of the covariates. However, cocaine-addicted subjects showed significantly higher plasma PEA concentrations than did controls in both men (\* $p < 0.01$ ) and women (\*\* $p < 0.01$ ).

A two-way ANCOVA revealed a significant primary effect of history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 13.79$ ,  $p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,122} = 16.07$ ,  $p < 0.001$ ) on plasma POEA concentrations (Figure 3C). Additionally, there was a significant interaction between history of cocaine addiction and sex ( $F_{1,122} = 8.45$ ,  $p = 0.004$ ). In this case, there was a significant relationship between BMI and POEA concentrations ( $F_{1,122} = 5.11$ ,  $p = 0.026$ ), and BMI explained 4.7% of the variance. Consequently, all pairwise

comparisons were performed using estimated marginal means with fixed values of covariates (age = 39.41 and BMI = 25.34). The confidence interval (CI) adjustments for the Bonferroni test indicated the following estimated marginal means of POEA concentrations and standard errors:  $0.084 \pm 0.008$  ng/mL (0.068–0.100, 95% CI) in control men,  $0.097 \pm 0.010$  ng/mL (0.077–0.11, 95% CI) in control women,  $0.093 \pm 0.009$  ng/mL (0.076–0.110, 95% CI) in cocaine-addicted men and  $0.170 \pm 0.015$  ng/mL (0.139–0.200, 95% CI) in cocaine-addicted women. Multiple comparisons with adjusted means indicated that the main effect of history of cocaine addiction was exclusively observed in cocaine-addicted women. A marked increase in plasma POEA concentrations was observed in cocaine-addicted women (\*\*\*) relative to control women but also in comparison with cocaine-addicted men (+++  $p < 0.001$ ). There were no changes in POEA concentrations in men.

Regarding the other monounsaturated lipid derivative (Figure 3D), plasma OEA concentrations were only affected by cocaine use ( $F_{1,122} = 30.73$ ,  $p < 0.001$ ). There was a significant relationship between age and OEA concentrations ( $F_{1,122} = 6.84$ ,  $p = 0.010$ ), and the covariate explained 6.2% of the variance. The adjusted means (age = 39.41 and BMI = 25.34) of OEA concentrations and standard errors of the means were as follows:  $2.263 \pm 0.137$  ng/mL (1.991–2.536, 95% CI) in control men,  $2.120 \pm 0.175$  ng/mL (1.774–2.466, 95% CI) in control women,  $3.258 \pm 0.147$  ng/mL (2.966–3.550, 95% CI) in cocaine-addicted men and  $3.180 \pm 0.259$  ng/mL (2.666–3.693, 95% CI) in cocaine-addicted women. Multiple comparisons of these adjusted means indicated that the cocaine group had significantly higher plasma OEA concentrations than did the controls in both men (\*\* $p < 0.01$ ) and women (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).



**FIGURE 3 | Plasma concentrations of *N*-acyl-ethanolamines in abstinent cocaine-addicted and control subjects grouped by sex. (A) SEA (ng/mL); (B) PEA (ng/mL); (C) POEA (ng/mL); (D) OEA (ng/mL); (E) AEA (ng/mL); and (F) LEA (ng/mL). The bars represent means  $\pm$  SD. The data were analyzed by two-way ANCOVA and multiple comparison tests. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ ,**

and (\*\*\*)  $p < 0.001$  denote significant differences compared with the respective control men or control women. (+++)  $p < 0.001$  denotes significant differences compared with cocaine-addicted men. POEA, OEA, and AEA concentrations are adjusted means with the following values of covariates: age = 39.41 years and BMI = 25.34.

Two polyunsaturated *N*-acyl-ethanolamines, AEA and LEA, were also measured and statistically analyzed. Similar to OEA and the saturated lipid mediators, history of cocaine addiction produced a main effect on plasma AEA concentrations ( $F_{1,122} = 38.59$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 3E). However, there was a significant effect of BMI ( $F_{1,122} = 6.29$ ,  $p = 0.014$ ) that explained 5.8% of the variance. The estimated marginal means (age = 39.41

and BMI = 25.34) of AEA concentrations were as follows:  $0.467 \pm 0.032$  ng/mL (0.404–0.530, 95% CI) in control men,  $0.421 \pm 0.040$  ng/mL (0.341–0.501, 95% CI) in control women,  $0.668 \pm 0.034$  ng/mL (0.601–0.736, 95% CI) in cocaine-addicted men and  $0.753 \pm 0.060$  ng/mL (0.634–0.872, 95% CI) in cocaine-addicted women. The paired comparisons showed that both cocaine-addicted men and women had a significant increase in

AEA concentrations (\*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , respectively) compared with their respective controls.

When LEA concentrations were analyzed (Figure 3F), we observed a significant primary effect of history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 45.80$ ,  $p < 0.001$ ). Here, an interaction between both factors was also detected ( $F_{1,122} = 5.58$ ,  $p = 0.020$ ). BMI and age had no effect on LEA concentrations. Multiple comparisons showed significant increases in the plasma LEA concentrations of cocaine-addicted men (\*\* $p < 0.001$ ) and women (\*\* $p < 0.001$ ) in comparison with their respective controls, but we observed no differences between both sexes.

Overall, free *N*-acyl-ethanolamine concentrations were found to be increased in the plasma of cocaine-addicted subjects with no effect of sex. However, there were two exceptions: (i) SEA concentrations were decreased in the cocaine group and (ii) POEA concentrations were increased exclusively in cocaine-addicted women. The covariates age and BMI were found to be significantly related to the plasma concentrations of certain acyl derivatives (i.e., POEA, OEA, and AEA).

### 2-acyl-glycerols

As shown in Figure 4, the plasma concentrations of 2-AG and 2-LG were determined to be glycerol-derived molecules.

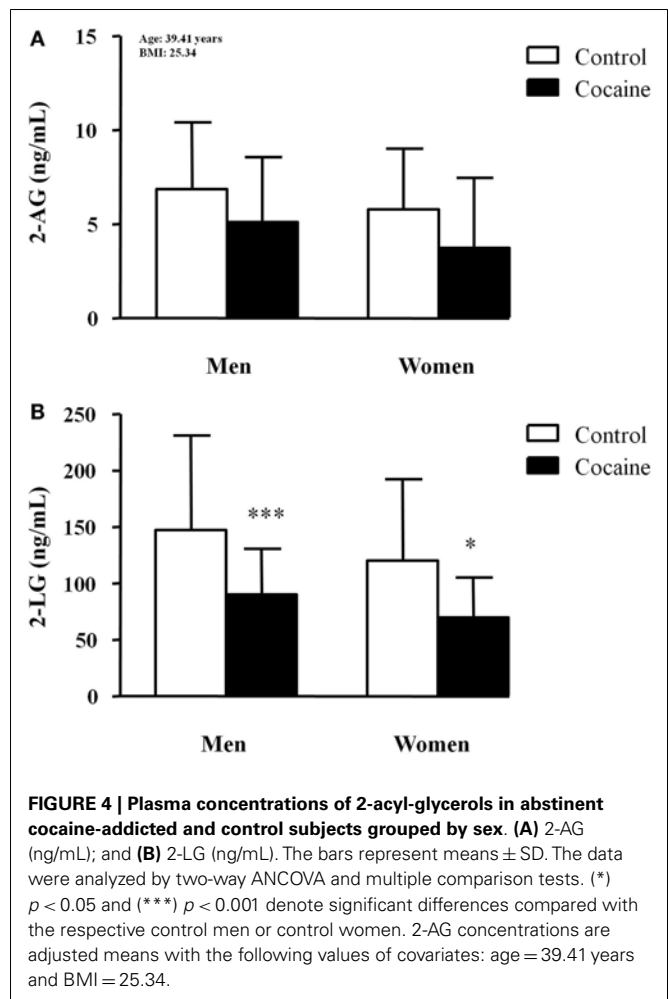
Statistical analysis revealed a significant main effect of history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 7.60$ ,  $p = 0.007$ ) on 2-AG concentrations (Figure 4A). There was a significant relationship between age and 2-AG concentrations ( $F_{1,122} = 9.85$ ,  $p = 0.002$ ), and the covariate explained 8.7% of the variance. The adjusted means (age = 39.41 and BMI = 25.34) of 2-AG concentrations and standard errors were as follows:  $6.869 \pm 0.508$  ng/mL (5.861–7.877, 95% CI) in control men,  $5.779 \pm 0.646$  ng/mL (4.497–7.060, 95% CI) in control women,  $5.116 \pm 0.545$  ng/mL (4.035–6.197, 95% CI) in cocaine-addicted men, and  $3.749 \pm 0.958$  ng/mL (1.849–5.650, 95% CI) in cocaine-addicted women. Paired comparisons did not indicate significant differences among groups.

Finally, we also found a significant primary effect of history of cocaine addiction ( $F_{1,122} = 16.57$ ,  $p < 0.001$ ) on plasma 2-LG concentrations. We observed no effects of age or BMI on the 2-LG concentrations. The *post hoc* tests indicated significant decreases in the 2-LG concentrations of cocaine-addicted subjects compared with the control group for both men (\*\* $p < 0.001$ ) and women (\* $p < 0.05$ ).

Unlike *N*-acyl-ethanolamines, the plasma concentrations of glycerol derivatives were decreased in the cocaine group, but sex differences were not found. Interestingly, there was a robust relationship between BMI and 2-AG concentrations.

### PLASMA CONCENTRATIONS OF CHEMOKINES, CYTOKINES, AND FATTY ACID DERIVATIVES IN SUBJECTS WITH A HISTORY OF COCAINE ADDICTION

The plasma concentrations of chemokines, cytokines, and fatty acid derivatives in the cocaine group were analyzed by univariate general linear models to evaluate their relationships with cocaine symptom severity, diagnosis of comorbid psychiatric disorders, and length of cocaine abstinence (Table 4). Additionally, the relationships with BMI, age, and sex were also evaluated.



We observed no relationships between plasma concentrations of chemokines and cytokines and such variables. In fact, the main effect of sex on cytokine concentrations in the control and cocaine groups was not observed when only the cocaine group was analyzed. However, the plasma concentrations of several fatty acid derivatives were found to be associated with certain variables.

Thus, SEA concentrations were related to the diagnosis of comorbid psychopathologies ( $p < 0.01$ ), and an increase in SEA concentrations was observed in cocaine-addicted subjects diagnosed with psychiatric comorbidity. As previously observed, POEA and AEA concentrations in the cocaine group were found to be affected by BMI ( $p < 0.05$ ). Additionally, there was a main effect of sex ( $p = 0.001$ ) on POEA concentrations. Regarding 2-acyl glycerol derivatives, whereas 2-AG concentrations were significantly affected by age and sex ( $p < 0.05$ ), 2-LG concentrations were affected by diagnosis of psychiatric comorbidity and sex ( $p < 0.05$ ). Similar to SEA, an increase in 2-LG concentrations was observed in cocaine subjects diagnosed with psychiatric comorbidity.

Thus, among the independent variables related to cocaine addiction in the cocaine group that were evaluated, we only found significant associations between comorbid psychiatric disorders and fatty acid derivative concentrations (i.e., SEA and 2-LG).



**Table 4 | Multiple relationships between plasma concentrations of chemokines, cytokines, and fatty acid derivatives (dependent variables) and independent variables in abstinent cocaine-addicted subjects.**

Dependent variable	Main effect (independent variable) <sup>a</sup>											
	Sex		Body mass index		Age		Length of cocaine abstinence		Cocaine symptom severity		Comorbid psychiatric disorders	
	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i>	<i>p</i> -value
UNIVARIATE GENERAL LINEAR MODELS												
CX3CL1 (fractalkine)	2.194	ns	0.930	ns	0.222	ns	0.010	ns	2.469	ns	0.354	ns
CCL2 (MCP-1)	0.005	ns	0.949	ns	0.657	ns	0.524	ns	0.687	ns	3.204	ns
CXCL12 (SDF-1)	0.452	ns	0.018	ns	0.026	ns	0.001	ns	2.651	ns	0.011	ns
IL-1β	1.162	ns	0.433	ns	0.545	ns	0.121	ns	2.550	ns	2.434	ns
IL-6	0.012	ns	0.272	ns	0.854	ns	0.411	ns	1.872	ns	3.690	ns
IL-10	2.103	ns	1.091	ns	2.407	ns	1.791	ns	1.033	ns	2.765	ns
TNFα	0.165	ns	0.004	ns	0.036	ns	0.076	ns	0.218	ns	3.032	ns
SEA	0.004	ns	0.774	ns	0.266	ns	1.408	ns	1.842	ns	<b>11.49</b>	<b>0.002</b>
PEA	1.246	ns	0.911	ns	1.116	ns	0.490	ns	1.746	ns	1.858	ns
OEA	0.300	ns	0.095	ns	1.181	ns	0.098	ns	0.501	ns	2.177	ns
POEA	<b>12.88</b>	<b>0.001</b>	<b>6.798</b>	<b>0.013</b>	0.011	ns	0.427	ns	0.185	ns	0.037	ns
AEA	0.453	ns	<b>4.578</b>	<b>0.039</b>	0.166	ns	0.265	ns	2.842	ns	2.691	ns
LEA	2.601	ns	3.458	ns	0.144	ns	0.138	ns	1.584	ns	0.946	ns
2-AG	<b>4.593</b>	<b>0.039</b>	0.149	ns	<b>6.619</b>	<b>0.014</b>	0.503	ns	0.004	ns	2.288	ns
2-LG	<b>6.703</b>	<b>0.014</b>	0.063	ns	2.981	ns	0.003	ns	0.692	ns	<b>6.897</b>	<b>0.012</b>

<sup>a</sup>Tests of between-subjects effects.

ns, non-significant.

Bold indicates statistically significant *p*-values.

## DISCUSSION

The present findings show that sex is a relevant modulatory factor in the presence of comorbid mental and substance use disorders in individuals with lifetime cocaine use disorders. As expected, cocaine-addicted men seeking treatment were more common than women. Whereas the abstinent cocaine-addicted men were characterized by increased rates of other substance use disorders such as alcohol and marijuana, the cocaine-addicted women showed a higher prevalence of comorbid mental disorders, such as mood, anxiety, and psychotic disorders. Additionally, the plasma concentrations of putative biomarkers for cocaine addiction and comorbidity were influenced by sex. In the present study, we examined sex differences in inflammatory mediators and fatty acid derivatives because these molecules were reported to be affected by the pathological use of cocaine (19, 20). The most relevant findings were that all of the evaluated inflammatory cytokines and the monounsaturated fatty acid derivative POEA were found to be differentially altered in cocaine-addicted women, extending the influence of sex to plasma biomarkers for cocaine addiction. In addition, SEA and 2-LG concentrations were associated with psychiatric comorbidity in abstinent cocaine-addicted subjects.

In the present study, subjects diagnosed with lifetime cocaine use disorders showed high rates of mental and other substance use disorders, as reported previously in cocaine users and abstinent cocaine-addicted subjects (11, 12, 27), and there were differences in the psychiatric prevalence according to sex. Several

epidemiological studies have observed significant sex differences among subjects diagnosed with mood and anxiety disorders. The incidence of mental disorders is enhanced in women compared with men, particularly in periods of life such as pregnancy, maternity, menopause, or after traumatic events (15). These elevated rates of lifetime psychiatric disorders in women have also been reported with substance use disorders (14, 28). Consistent with these previous studies, we diagnosed a higher prevalence of comorbid mental disorders (i.e., mood, anxiety, and psychosis) in women, whereas higher rates of other substance use disorders (especially with alcohol) were observed in cocaine-addicted men. As expected, the lifetime cocaine symptom severity was severe in both sexes with no differences with respect to length of abstinence and duration of cumulative cocaine use.

Collectively, these findings suggest that any potential biomarker for cocaine addiction and psychiatric comorbidity must account for the influence of sex. Recent evidence indicates that cocaine and other psychostimulants alter the peripheral concentration of circulating mediators that may influence the cognitive and behavioral changes associated with the process of addiction. Among these mediators, we assessed the plasma concentrations of inflammatory mediators and fatty acid derivatives. Chemokines and proinflammatory mediators are affected by cocaine symptom severity, whereas anti-inflammatory fatty acid derivatives such as endocannabinoids and their congeners are affected by

the history of pathological use of cocaine and the presence of comorbid disorders. However, the impact of sex has not been sufficiently studied because the female population seeking outpatient treatment in centers for cocaine addiction is very low, as previously indicated (1).

### CHEMOKINE AND CYTOKINE CONCENTRATIONS

Growing evidence has demonstrated naturally occurring sex differences in the immune response and inflammatory mediators. During their reproductive years, women have a more potentiated cellular and humoral immune response than do men (29). Indeed, it is thought that fluctuations in estrogen may alter immune cell function by affecting cytokine and chemokine production (30). Furthermore, several recent reports have related inflammatory mediators in blood and cerebrospinal fluid to addiction to drugs of abuse, such as alcohol, psychostimulants, and opiates (31).

Chemokines are chemoattractants that are involved in leukocyte trafficking to the site of inflammation (32), but they also play an important role in neuronal development, maturation, survival, and regeneration in the central nervous system (CNS) (33). Therefore, cerebral changes underlying addiction and psychiatric comorbidities might be reflected in peripheral alterations. Recently, chemokines have been proposed as pathologically relevant biomarkers or therapeutic targets for psychiatric disorders (34). In fact, we found that the CCL2 and CXCL12 concentrations were decreased in both male and female cocaine users. These changes in circulating chemokines are in accordance with the results from another study in abstinent cocaine-addicted population, which suggested that these chemokines were biomarkers for the pathological use of cocaine, although we observed no changes in plasma CXCL12 concentrations (20). Moreover, we detected no differences by sex in the plasma concentrations of these chemokines.

In addition to chemokines, we evaluated plasma cytokine concentrations, including pro- and anti-inflammatory mediators. In this case, we found a clear sexual dimorphism in the circulating concentrations of all of the cytokines assessed in the present study. The plasma concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  were higher in healthy women compared with men. Interestingly, these differences were absent in subjects diagnosed with lifetime cocaine use disorders.

Previous studies have reported that chronic exposure to drugs of abuse, such as alcohol and cocaine, suppresses immune responses. Contradictory data have been published in relation to alcoholism. For instance, whereas a significant increase in the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and TNF $\alpha$  was observed in chronic alcoholics without liver disease, chronic alcoholics with liver disease who were drinking alcohol showed low production of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  (35). Regarding cocaine, it has been reported that cocaine-dependent subjects show a decreased capacity to express proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-6 in monocytes (36). Further, we have recently shown that abstinent cocaine-addicted subjects have low TNF $\alpha$  concentrations and IL-1 $\beta$  concentrations, and that they are affected by the cocaine symptom severity (20). Our data may be related to long-term cocaine-induced changes in cytokine concentrations, but these

changes were only produced in women with no effect in male addicts. The plasma concentrations of inflammatory cytokines were clearly reduced in women, and such cytokine reduction might be associated with decreased immune activity and an increased risk of developing mental disorders (15, 37). However, plasma concentrations of chemokines and cytokines were not associated with sex and comorbid psychopathologies in cocaine-addicted subjects.

### FATTY ACID DERIVATIVE CONCENTRATIONS

Several lines of evidence suggest that bioactive lipids, such as endocannabinoids and related congeners, are involved in the acquisition and maintenance of drug-taking behavior and other processes associated with addiction (38, 39). However, all of these studies are based on preclinical observations because there are few studies concerning plasma lipid derivatives in individuals with substance use disorders (40, 41), principally with alcohol use (42, 43). Endocannabinoids act on cannabinoid receptors to exert their effects and are composed of two structural types of lipid derivatives: *N*-acyl-ethanolamines (e.g., AEA) and 2-acyl-glycerols (e.g., 2-AG).

Clinical studies in alcohol users reported that alcohol use affects circulating endocannabinoid concentrations after moderate and chronic consumption (42, 43). Regarding cocaine use, we recently showed that *N*-acyl-ethanolamine concentrations are increased in abstinent cocaine addicts, whereas both 2-AG and 2-LG are reduced (19). Interestingly, distinct profiles of both endocannabinoid types (AEA and 2-AG) have also been described in distinct brain areas after administering drugs of abuse in rodents (44, 45). In agreement with these studies, the present study shows that plasma concentrations of all lipid-derived molecules were distinctly affected by history of cocaine addiction. All *N*-acyl-ethanolamines, except SEA, were found to be increased in cocaine-addicted subjects, but 2-acyl-glycerols were decreased in relation to healthy subjects. Overall, we observed no sex differences in the changes of plasma concentrations of fatty acid derivatives. However, the POEA concentrations were found to be altered exclusively in women diagnosed with lifetime cocaine use disorders. Our current data show that plasma POEA was markedly increased in abstinent cocaine-addicted women, and similar changes have been previously observed in another study with cocaine addicts who were diagnosed with comorbid mood or anxiety disorders (19). Little is known about POEA, but it has been suggested that it regulates appetite and energy metabolism through a non-cannabinoid receptor (46, 47). Interestingly, palmitoleate is the fatty acid from which POEA is derived, and the former has been suggested to be a lipokine associated with metabolic abnormalities (48). In fact, we observed a significant effect of BMI on POEA concentrations of our sample, and this influence stayed with the cocaine group. However, there are no data related to the role of POEA in psychopathologies and addiction. In the present study, we did not observe relationships between POEA concentrations and variables related cocaine addiction such as length of abstinence, cocaine symptom severity, or diagnosis of comorbid psychopathologies, but sex was strongly associated with POEA in cocaine-addicted subjects. Although the small number of cocaine-addicted women does not allow for a conclusion of the impact of comorbid mental

disorders on POEA concentrations, we must note that female addicts have a higher prevalence of psychiatric comorbidity than do men.

The associations between circulating endocannabinoids and mental disorders have been extensively studied in clinical studies, and a common observation found in these disorders is the elevated concentrations of *N*-acyl-ethanolamines (49–51). Further, increased *N*-acyl-ethanolamine concentrations have been observed in psychiatric patients with substance use disorders, such as in schizophrenia patients (40). Accordingly, we observed a significant relationship between SEA and diagnosis of comorbid psychiatric disorders in cocaine-addicted subjects, with higher concentrations in comorbid addicts. However, classical endocannabinoids such as AEA and 2-AG were not influenced by comorbidity.

### LIMITATIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

Our findings support the importance of monitoring these putative predictors in the context of a history of cocaine addiction by accounting for both sex differences and psychiatric comorbidity.

We are aware of the limitations of the current study. First, the number of cocaine-addicted women is small, and replicating these data with a larger sample will be necessary to confirm the sexual dimorphism observed in the present study, primarily in plasma cytokines and POEA. Second, we must determine whether these alterations in cocaine-addicted women are exclusively attributable to sex or to comorbid psychiatric disorders. Therefore, new studies in female psychiatric patients with no history of drug abuse will be necessary to elucidate the influence of mental disorders in these circulating predictors of cocaine addiction. Related to these mentioned limitations, women were randomly recruited without considering the menstrual cycle, and this condition should be considered in future studies including cocaine-addicted women. Third, with regard to the cocaine use effect, we are unaware of the effects on the plasma concentrations of these molecules in active cocaine users because the presence of cocaine can induce prolonged activation, and the present data were obtained from subjects with a history of addiction. Animal models can be a useful tool to perform future investigations for responding to these questions. Finally, the recruitment of abstinent cocaine-addicted subjects under treatments in centers for addiction was performed on an outpatient basis; consequently, medications as well as social and environmental factors must be considered.

In summary, whereas the plasma concentrations of inflammatory and fatty acid-derived mediators may allow for a better stratification of cocaine addicts, the sexual dimorphism must also be considered for the adequate selection of biomarkers for cocaine addiction and therapeutic purposes.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

FRF and FJP were responsible for the study concept and design. MP, PA, NGM, and JJR coordinated and recruited participants from outpatient treatment centers for addiction. MP, PA, NGM, and PR-S contributed to the acquisition of psychiatric data by means of interviews. AS, JS, and ECO processed the blood samples. AP and RdT supervised and performed the benzoylecgonine

detection and the quantification of fatty acid derivatives in plasma. VB, JAC, and JA supervised and performed the quantification of cytokines and chemokines in plasma. FJP, AS, and PA assisted with data analysis and interpretation of findings. FRF and FJP drafted the manuscript. MT, RdT, and JA provided critical revision of the manuscript for important intellectual content. All the authors critically reviewed the content and approved the version for publication.

### ACKNOWLEDGMENTS

The present study has been supported by Instituto de Salud Carlos III (ISC-III), Red de Trastornos Adictivos UE-FEDER 2012 (RD12/0028); Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/02261); Plan Nacional sobre Drogas 049/2009 and 049/2013; Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía UE-FEDER (CTS-433); Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía (PI0228-2013 and PI0823-2012); Departament d'Innovació, Universitat i Empresa, Generalitat de Catalunya (2014-SGR-680). JS, AS, and FJP hold a “Miguel Servet” research contract from ISC-III (CP12/03109, CP14/00173, and CP14/00212, respectively). PRS holds a “Río Hortega” research contract from ISC-III (CM13/0115). ECO holds a “Sara Borrell” research contract from ISC-III (CD12/00455). The authors would like to thank all coordinators of the Centros de Tratamiento de Adicciones (Diputación Provincial de Málaga) for outstanding collaboration in the recruitment of participants.

### REFERENCES

1. EMCDDA. Annual report 2012: the state of the drugs problem in Europe. *Euro Surveill* (2012) 17:20315.
2. Andersen ML, Sawyer EK, Howell LL. Contributions of neuroimaging to understanding sex differences in cocaine abuse. *Exp Clin Psychopharmacol* (2012) 20:2–15. doi:10.1037/a0025219
3. Becker JB, Hu M. Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* (2008) 29:36–47. doi:10.1016/j.yfrne.2007.07.003
4. Kennedy AP, Epstein DH, Phillips KA, Preston KL. Sex differences in cocaine/heroin users: drug-use triggers and craving in daily life. *Drug Alcohol Depend* (2013) 132:29–37. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.12.025
5. Bobzean SA, Denobrega AK, Perrotti LI. Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol* (2014) 259:64–74. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.022
6. Quinones-Jenab V, Jenab S. Influence of sex differences and gonadal hormones on cocaine addiction. *ILAR J* (2012) 53:14–22. doi:10.1093/ilar.53.1.14
7. Robbins SJ, Ehrman RN, Childress AR, O'Brien CP. Comparing levels of cocaine cue reactivity in male and female outpatients. *Drug Alcohol Depend* (1999) 53:223–30. doi:10.1016/S0376-8716(98)00135-5
8. Winhusen T, Lewis D. Sex differences in disinhibition and its relationship to physical abuse in a sample of stimulant-dependent patients. *Drug Alcohol Depend* (2013) 129:158–62. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.09.014
9. Back SE, Brady KT, Jackson JL, Salstrom S, Zinzow H. Gender differences in stress reactivity among cocaine-dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* (2005) 180:169–76. doi:10.1007/s00213-004-2129-7
10. Festa ED, Quinones-Jenab V. Gonadal hormones provide the biological basis for sex differences in behavioral responses to cocaine. *Horm Behav* (2004) 46:509–19. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.04.009
11. Herrero MJ, Domingo-Salvany A, Torrens M, Brugal MT. Psychiatric comorbidity in young cocaine users: induced versus independent disorders. *Addiction* (2008) 103:284–93. doi:10.1111/j.1360-0443.2007.02076.x
12. Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavon FJ, Campos Cloute R, Calado M, et al. [Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment]. *Adicciones* (2014) 26:15–26.

13. Fattore L, Altea S, Fratta W. Sex differences in drug addiction: a review of animal and human studies. *Womens Health (Lond Engl)* (2008) **4**:51–65. doi:10.2217/17455057.4.1.51
14. Greenfield SF, Back SE, Lawson K, Brady KT. Substance abuse in women. *Psychiatr Clin North Am* (2010) **33**:339–55. doi:10.1016/j.psc.2010.01.004
15. Fernandez-Guasti A, Fiedler JL, Herrera L, Handa RJ. Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Horm Metab Res* (2012) **44**:607–18. doi:10.1055/s-0032-1312592
16. Domenici E, Muglia P. The search for peripheral disease markers in psychiatry by genomic and proteomic approaches. *Expert Opin Med Diagn* (2007) **1**:235–51. doi:10.1517/17530059.1.2.235
17. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One* (2010) **5**:e9166. doi:10.1371/journal.pone.0009166
18. Sinha R. New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr Psychiatry Rep* (2011) **13**:398–405. doi:10.1007/s11920-011-0224-0
19. Pavon FJ, Araos P, Pastor A, Calado M, Pedraz M, Campos-Cloute R, et al. Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* (2013) **18**:955–69. doi:10.1111/adb.12107
20. Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, Garcia-Marchena N, et al. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* (2014). doi:10.1111/adb.12156
21. Hasin DS, Trautman KD, Miele GM, Samet S, Smith M, Endicott J. Psychiatric research interview for substance and mental disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry* (1996) **153**:1195–201. doi:10.1176/ajp.153.9.1195
22. Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R. Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the psychiatric research interview for substance and mental disorders and the structured clinical interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry* (2004) **161**:1231–7. doi:10.1176/appi.ajp.161.7.1231
23. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, et al. The composite international diagnostic interview – an epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry* (1988) **45**:1069–77. doi:10.1001/archpsyc.1988.01800360017003
24. Hasin D, Samet S, Nunes E, Meydan J, Matseane K, Waxman R. Diagnosis of comorbid psychiatric disorders in substance users assessed with the psychiatric research interview for substance and mental disorders for DSM-IV. *Am J Psychiatry* (2006) **163**:689–96. doi:10.1176/appi.ajp.163.4.689
25. Morgello S, Holzer CE III, Ryan E, Young C, Naseer M, Castellon SA, et al. Interrater reliability of the psychiatric research interview for substance and mental disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS Tissue Consortium. *Int J Methods Psychiatr Res* (2006) **15**:131–8. doi:10.1002/mpr.189
26. Rivera P, Luque-Rojas MJ, Pastor A, Blanco E, Pavon FJ, Serrano A, et al. Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *Eur J Neurosci* (2013) **37**:105–17. doi:10.1111/ejn.12012
27. Vergara-Moragues E, Gonzalez-Saiz F, Lozano OM, Betanzos Espinosa P, Fernandez Calderon F, Bilbao-Acebo I, et al. Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community: substance-induced versus independent disorders. *Psychiatry Res* (2012) **200**:734–41. doi:10.1016/j.psychres.2012.07.043
28. Conway KP, Compton W, Stinson FS, Grant BF. Lifetime comorbidity of DSM-IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *J Clin Psychiatry* (2006) **67**:247–57. doi:10.4088/JCP.v67n0211
29. Schuurs AH, Verheul HA. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* (1990) **35**:157–72. doi:10.1016/0022-4731(90)90270-3
30. Kovacs EJ, Messingham KA. Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health* (2002) **26**:257–63.
31. Collier JK, Hutchinson MR. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther* (2012) **134**:219–45. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.01.008
32. Trecki J, Unterwald EM. Modulation of cocaine-induced activity by intracerebral administration of CXCL12. *Neuroscience* (2009) **161**:13–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.027
33. Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* (2011) **25**(Suppl 1):S4–12. doi:10.1016/j.bbi.2011.03.003
34. Stuart MJ, Baune BT. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev* (2014) **42**:93–115. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.02.001
35. Achur RN, Freeman WM, Vrana KE. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol* (2010) **5**:83–91. doi:10.1007/s11481-009-9185-z
36. Irwin MR, Olmos L, Wang M, Valladares EM, Motivala SJ, Fong T, et al. Cocaine dependence and acute cocaine induce decreases of monocyte proinflammatory cytokine expression across the diurnal period: autonomic mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* (2007) **320**:507–15. doi:10.1124/jpet.106.112797
37. Salim S, Chugh G, Asghar M. Inflammation in anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol* (2012) **88**:1–25. doi:10.1016/B978-0-12-398314-5.00001-5
38. Serrano A, Parsons LH. Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther* (2011) **132**:215–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.06.005
39. Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, et al. Oleylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* (2013) **18**:78–87. doi:10.1111/adb.12006
40. Potvin S, Kouassi E, Lipp O, Bouchard RH, Roy MA, Demers MF, et al. Endogenous cannabinoids in patients with schizophrenia and substance use disorder during quetiapine therapy. *J Psychopharmacol* (2008) **22**:262–9. doi:10.1177/0269881107083816
41. Desfossez J, Stip E, Bentaleb LA, Lipp O, Chiasson JP, Furtos A, et al. Plasma endocannabinoid alterations in individuals with substance use disorder are dependent on the “mirror effect” of schizophrenia. *Front Psychiatry* (2012) **3**:85. doi:10.3389/fpsy.2012.00085
42. Mangieri RA, Hong KI, Piomelli D, Sinha R. An endocannabinoid signal associated with desire for alcohol is suppressed in recently abstinent alcoholics. *Psychopharmacology (Berl)* (2009) **205**:63–72. doi:10.1007/s00213-009-1518-3
43. Feurecker M, Hauer D, Gresset T, Lassas S, Kaufmann I, Vogeser M, et al. Effect of an acute consumption of a moderate amount of ethanol on plasma endocannabinoid levels in humans. *Alcohol Alcohol* (2012) **47**:226–32. doi:10.1093/alcal/agr162
44. Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* (2002) **954**:73–81. doi:10.1016/S0006-8993(02)03344-9
45. Caille S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci* (2007) **27**:3695–702. doi:10.1523/JNEUROSCI.4403-06.2007
46. Lambert DM, Muccioli GG. Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2007) **10**:735–44. doi:10.1097/MCO.0b013e3282f00061
47. Syed SK, Bui HH, Beavers LS, Farb TB, Ficorilli J, Chesterfield AK, et al. Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2012) **303**:E1469–78. doi:10.1152/ajpendo.00269.2012
48. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, et al. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr* (2010) **92**:1350–8. doi:10.3945/ajcn.110.003970
49. De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis* (2003) **2**:5. doi:10.1186/1476-511X-2-5
50. Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ. Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* (2008) **41**:48–53. doi:10.1055/s-2007-993211

51. Schwarz E, Whitfield P, Nahnsen S, Wang L, Major H, Leweke FM, et al. Alterations of primary fatty acid amides in serum of patients with severe mental illness. *Front Biosci (Elite Ed)* (2011) **3**:308–14. doi:10.2741/e246

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 17 November 2014; accepted: 29 January 2015; published online: 16 February 2015.

Citation: Pedraz M, Araos P, García-Marchena N, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Castilla-Ortega E, Mayoral-Cleries F, Ruiz JJ, Pastor A, Barrios V, Chowen JA, Argente J, Torrens M, de la Torre R, Rodríguez De Fonseca F and Pavón FJ (2015)

*Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. Front. Psychiatry* **6**:17. doi: 10.3389/fpsyt.2015.00017

This article was submitted to Addictive Disorders and Behavioral Dyscontrol, a section of the journal *Frontiers in Psychiatry*.

Copyright © 2015 Pedraz, Araos, García-Marchena, Serrano, Romero-Sanchiz, Suárez, Castilla-Ortega, Mayoral-Cleries, Ruiz, Pastor, Barrios, Chowen, Argente, Torrens, de la Torre, Rodríguez De Fonseca and Pavón. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## V. DISCUSION

La búsqueda de pruebas objetivas de enfermedad que puedan ayudar a entender, clasificar y mejorar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad mental es un reto vigente en la medicina moderna, y una necesidad para los pacientes. Los diagnósticos y clasificaciones basados sólo en la agrupación de síntomas de enfermedad aunque han ayudado mucho en el desarrollo de la psiquiatría y psicología clínicas modernas, son insuficientes si consideramos cuál es el conocimiento real sobre estas enfermedades y la relativa eficacia de sus tratamientos. En el ámbito preciso de la comorbilidad psiquiátrica en adicciones este problema se agrava al abordar pacientes complejos con al menos dos diagnósticos, incluyendo el correspondiente trastorno por abuso de sustancias. Esta tesis ha abordado este problema tratando de identificar biomarcadores objetivos que pudieran ayudar en la compleja estratificación de los pacientes adictos con patologías asociadas. Para ello se ha seleccionado como fuente de dichos biomarcadores los procesos psico-neuro-endocrino-inmunológicos que subyacen al desarrollo de adicción a cocaína, al ser estos procesos pertenecientes a un ámbito de estudio completamente nuevo, en el que la neuroinflamación aparece como un componente necesario de cualquier enfermedad neuropsiquiátrica. El estudio se basa en considerar todos estos procesos como un continuo interrelacionado y dinámico. Se persigue, además, integrar la investigación básica con la clínica, para un eficaz trasvase de información, con el objetivo prioritario de crear herramientas diagnósticas y terapéuticas. Abordando la naturaleza cambiante del fenómeno adictivo, penetración social y abordaje clínico y social. Siempre enfocado hacia una mejora de los tratamientos de estos pacientes, francamente deficitarios en la actualidad.

Dentro del marco de esta tesis se presentan los siguientes hallazgos:

1. En primer lugar los resultados mostraron que **la exposición a cocaína modifica los niveles circulantes de mediadores pro-inflamatorios. Concretamente la concentración de citoquinas y quemoquinas evaluadas en plasma periférico, las cuales se encontraban alteradas tras un uso patológico de cocaína en usuarios en abstinencia.** De entre estas moléculas de señalización del sistema inmunológico destacan TNF $\alpha$  y SDF-1, que permiten diferenciar usuarios de cocaína y controles sanos. Dentro del grupo de consumidores de cocaína, se encontró que las concentraciones de IL-1 $\beta$ , fractalquina y SDF-1, correlacionaban positivamente con criterios de gravedad de abuso y dependencia (DSM-IV TR) de cocaína. Estas citoquinas permitieron la categorización de pacientes en subgrupos de acuerdo a la gravedad, algo que no se había observado hasta la fecha. Es importante destacar que se encontró que a mayor gravedad de la adicción, los pacientes presentaban mayor comorbilidad psicopatológica, lo que abre la pregunta de cuál es el mecanismo por el cual la gravedad en la adicción se asocia tanto a cambios en el sistema inmunológico como a la presencia de patología psiquiátrica asociada.
2. **El uso patológico de cocaína no influye en la concentración plasmática periférica de los factores de crecimiento BDNF e IGF-1 y la proteína vinculada IGFBP-3.** No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de estas moléculas entre consumidores de cocaína y grupo control. Tampoco se encontraron asociaciones en relación a

moléculas sensibles a efectos de consumo de cocaína, así como al patrón de consumo y gravedad de adicción a cocaína. Este resultado desvincula a priori la adicción a cocaína de los cambios en factores neurogénicos circulantes en un contexto de adicción pura a este psicoestimulante. **Sin embargo, sí se encontró exclusivamente disminuida la concentración plasmática de BDNF en usuarios de cocaína diagnosticados con trastornos de estado de ánimo y ansiedad, primarios e inducidos.**

**3. Los resultados demostraron que el sexo es determinante para el estudio de los posibles marcadores biológicos de adicción a cocaína y sobre la presencia de comorbilidad psicopatológica. Se encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de mediadores pro-inflamatorios según el sexo.** Partiendo de diferencias entre hombres y mujeres en el grupo control, se mostró una diferente afectación del uso patológico de cocaína según el sexo. Mientras que las concentraciones de citoquinas eran más elevadas en mujeres control que en hombres, estas concentraciones estaban reducidas en mujeres adictas a cocaína sin cambios en hombres adictos. Respecto a las concentraciones de moléculas de señalización derivadas de ácidos grasos aciletanolamidas y acilglicerol, en las cuales el historial de cocaína tenía un mayor efecto en conjunto que en las concentraciones de cada derivado de ácido graso. Mientras las aciletanolamidas estaban incrementadas en todo el grupo de usuarios de cocaína, los 2-acilglicerol se encontraban disminuidos. Cabe destacar que una aciletanolamida, la POEA se encontraba solo incrementada en mujeres adictas, siendo por tanto un biomarcador específico de sexo. **Las mujeres adictas a cocaína presentaban mayores prevalencias de trastornos psiquiátricos (estado de ánimo, ansiedad y psicosis) y los hombres mostraron más comorbilidad de TUS a otras sustancias de abuso.**

En conclusión la exposición a cocaína modifica los niveles circulantes de mediadores pro-inflamatorios, pero no de otros mediadores plasmáticos, como los factores de crecimiento. Destacar que BDNF si se encontraba afectado por trastornos de estado de ánimo comórbidos. Dada la implicación de BDNF e IGF-1 en plasticidad neuronal, neurogénesis y supervivencia neuronal se debe seguir investigando sobre su papel en los procesos de desarrollo de la adicción y comorbilidad psiquiátrica. Destacar la necesidad de tener en cuenta factores como el sexo sobre estos posibles marcadores biológicos.

Dada la falta actual de tratamientos eficaces para la adicción a cocaína, la elevada tasa de recaídas y el hecho de que la mayoría de los tratamientos actuales se centran en el tratamiento de la comorbilidad psicopatológica. Así como la necesidad de especialización de tratamientos según el sexo. Es necesario el estudio de los procesos subyacentes a la etiología de la adicción a cocaína y el papel de los diferentes sistemas implicados, desde la interacción de los diferentes sistemas que regulan la homeostasis interna del individuo, así como sus interacciones e implicación en los procesos de adicción y la vulnerabilidad al desarrollo de comorbilidad psiquiátrica.

#### ***Psico-neuro-endocrino-inmunología: Interacción de los diferentes sistemas***

La evidencia científica publicada en los últimos años destaca la existencia de interacciones entre la producción de citoquinas del sistema inmunológico y las funciones cerebrales sobre las que influye. Estas observaciones revelan una parte de las interacciones bidireccionales que existen entre las actividades de los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico y son una



consecuencia de que las células de los tres sistemas comparten la capacidad de sintetizar las citoquinas y de expresar sus receptores (Besedovsky & Del Rey 1996). Estos factores influyen al ser sistemas de señalización que modulan la capacidad homeostática del individuo para adaptarse al medio y el impacto de factores externos, en este caso la presencia de drogas como la cocaína. De todas las citoquinas estudiadas, las que presentan una mayor influencia en actividad cerebral son aquellas que tienen la función de inducir y/o modular las reacciones inflamatorias, ya que se han encontrado niveles alterados en concentraciones de pacientes con trastornos mentales, destacando su relevante papel en neurogénesis (Borsini et al. 2015). Por ejemplo, en pacientes deprimidos tanto la desregulación del sueño como la privación de sueño se han asociado con un aumento de la interleucina IL-6, al igual que de la activación del factor nuclear kappa B (NF-kappaB), un factor de transcripción primario en la iniciación de la respuesta inflamatoria (Motivala et al. 2005; Irwin et al 2008).

Los hallazgos, por tanto de esta tesis, se integrarían en una nueva área de investigación que ha sido denominada psico-neuro-endocrino-inmunología. Una parte importante de los trabajos en esta disciplina se ocupa de estudiar las consecuencias psico-neuro-endocrinológicas de las alteraciones en la producción de las citoquinas como las que hemos observado. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de cómo la presencia diferencial en el plasma circulante de mediadores del sistema inmunológico, puede afectar a diversos procesos fisiológicos y patológicos relacionados con adicción, al modular las funciones cerebrales de los individuos adictos.

Así por ejemplo, desde hace años se conoce que las hormonas del sistema endocrino y las citoquinas del sistema inmune pueden influir sobre la actividad de las neuronas del cerebro, hasta el punto de que llegan a modificar el comportamiento de las personas (Rivest et al 2000). Por otra parte, también se ha observado que algunas alteraciones en la conducta pueden influir sobre las concentraciones plasmáticas de varias hormonas y/ o citoquinas (Elenkov et al 2000). No obstante, se desconocen las interacciones en profundidad de estos sistemas. Los efectos de las citoquinas y las hormonas sobre las células del sistema nervioso son mucho más amplios y lo mismo se puede decir de las consecuencias que tiene una conducta alterada sobre los sistemas inmune y endocrino.

A nivel molecular, existen otros sistemas de señalización además de los mediadores inmunológicos estudiados y que interactúan con los sistemas cerebrales citados, encontrándose tanto en plasma periférico como a nivel cerebral. Un ejemplo de estos es el sistema endocannabinoide, un sistema de señalización lipídico que interviene en diferentes funciones de importancia relevante para el sistema nervioso y el organismo en conjunto. Estas funciones incluyen desde la excitabilidad neuronal, a la interacción con sistemas principales de neurotransmisión y los procesos de plasticidad, incluyendo la neurogénesis en hipocampo o hipotálamo. Estas interacciones modificarán el apetito, el balance energético y el metabolismo, la respuesta a estrés, la función reproductiva en la mujer, la analgesia, o la termorregulación. Además, estos sistemas (transmisores lipídicos, o quimio-citoquinas) interaccionan entre sí, modificando la función de los sistemas inmunológico y nervioso autónomo, lo que es de gran importancia para entender los procesos adictivos a nivel molecular (Pavon et al. 2013).



En el caso de los factores de crecimiento, estos ayudan además en los procesos de mantenimiento cerebral, incluyendo la reparación pos-inflamación, a través de sus acciones sobre la diferenciación celular, maduración, plasticidad neuronal, entre otras múltiples funciones en cerebro.

Desde el punto de vista de la adicción a cocaína, proceso en el cual se ven afectados múltiples sistemas del individuo, hemos encontrado que algunos de estos sistemas están directamente afectados por el consumo de este psicoestimulante, y por lo tanto se pone de manifiesto la necesidad de su estudio para la comprensión de su papel dentro de los procesos de adicción. Si tenemos en cuenta que, por ejemplo, las citoquinas inflamatorias acceden al cerebro a través de la barrera hematoencefálica e interaccionan con prácticamente todas las esferas fisiopatológicas conocidas, incluido el metabolismo de los neurotransmisores, la función neuroendocrina y la plasticidad neural, los cambios inducidos en ellas por la cocaína pueden ser responsables de parte del fenotipo observado en los adictos. De hecho, estos cambios tienen antecedentes de evidencia científica contrastada en una enfermedad psiquiátrica prevalente, como es la depresión. Las citoquinas y quemoquinas tienen la capacidad de poder influir en la síntesis y receptación de neurotransmisores relevantes en el estado de ánimo, incluyendo monoaminas y glutamato en áreas relacionadas con la recompensa y centros relacionados con la abstinencia (Guyon et al. 2009). Como discutiremos más adelante, podríamos destacar de todas ellas a la fractalquina propuesta como responsable de la poda sináptica en momentos de vulnerabilidad cerebral a drogas como la adolescencia, así como reguladora de la proliferación celular en hipocampo (Stuart & Baune 2014; Stuart et al. 2014). Estas acciones podrían ubicarla en los procesos celulares de plasticidad necesarios para la consolidación del fenotipo adicto (Mandyam & Koob 2012).

Por lo tanto, estos mediadores podrían jugar un importante papel en el desarrollo de la adicción así como en otros trastornos por uso de sustancias que compartan los mismos neurotransmisores que son diana para la cocaína (Miller 2009; Crews et al. 2011). Si consideramos específicamente el impacto de las citoquinas y factores tróficos sobre la neurotransmisión dopaminérgica que constituye la vía de la recompensa, estos mediadores adquieren un papel aún más destacado. Así, mientras los factores de crecimiento proporcionan un soporte trófico a las neuronas dopaminérgicas a la vez que activan la neurogénesis hipocampal (Bachstetter et al. 2011), las quemoquinas y citoquinas pueden modular la supervivencia de éstas células de dopamina agravando su viabilidad en el contexto de neuroinflamación (Koprach et al. 2008; Cipriani et al. 2011). Estas acciones nos demuestran la necesidad de profundizar en el estudio del papel de estas proteínas circulantes como moduladores del sistema de recompensa a nivel celular y de los centros que controlan las memorias afectivas como el hipocampo.

#### **Estudio I. Perfil plasmático de mediadores pro-inflamatorios en usuarios de cocaína en abstinencia: Influencia de la gravedad de adicción y comorbilidad psiquiátrica**

La potencial contribución de la inflamación crónica en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, así como en los trastornos neuropsiquiátricos (Miller et al. 2009; Stuart & Baune 2014) marca una nueva visión de los procesos subyacentes y compartidos por diferentes patologías. De hecho, existen múltiples estudios que relacionan las

concentraciones de mediadores inflamatorios, citoquinas y quemoquinas, en sangre y líquido cerebroespinal con depresión mayor y ansiedad (Salim et al. 2012), enfermedades neurodegenerativas (Li et al. 2011; Montgomery & Bowers 2012), y adicción a sustancias de abuso (Coller & Hutchinson 2012). Publicaciones científicas recientes sugieren que las citoquinas tienen un papel relevante en la adicción a drogas de abuso. Los psicoestimulantes afectan al sistema inmunológico y alteran los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias, las cuales influyen en los cambios cognitivos y de comportamiento en roedores (Yamada & Nabeshima 2004) al producir una activación o potenciación de las señales del sistema inmune en áreas y vías relacionadas con los procesos adictivos (Coller & Hutchinson 2012). Se ha demostrado que en el SNC, las citoquinas y quemoquinas interactúan con el metabolismo de neurotransmisores y la plasticidad neuronal en cerebro (Dantzer et al. 2008).

En este estudio se han encontrado disminuidos los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas en consumidores de cocaína en abstinencia, lo cual permite diferenciar sujetos con un historial de consumo a cocaína de sujetos sin dicho historial. No obstante, solo TNF $\alpha$ , MCP-1 y SDF-1 se encontraron significativamente disminuidas en el plasma de estos pacientes. No podemos concluir que estos cambios son específicos del trastorno por uso de cocaína porque su implicación en otros procesos patológicos ya ha sido descrita. Entre otros, estudios clínicos previos sugieren que dichas citoquinas pueden ser como marcadores biológicos de otras enfermedades, como por ejemplo en fibrosis hepática derivada de VIH en pacientes alcohólicos (Fuster et al. 2013) y en poblaciones con mayor riesgo de trastorno bipolar (Brietzke et al. 2012). Un hecho importante, sin embargo, es la observación de la persistencia de los cambios en estos factores circulantes. Los resultados de este estudio muestran la existencia de alteraciones a posteriori del consumo, reflejados en los cambios en las concentraciones plasmáticas de estas citoquinas/quemoquinas, ya que el estudio se realizó en sujetos en abstinencia tras un periodo prolongado de consumo patológico de cocaína, corroborando que se puede medir una huella biológica cuya permanencia se extiende más allá de la abstinencia temprana.

Por otro lado, los resultados muestran la asociación entre los criterios de gravedad de la adicción a cocaína (abuso y dependencia DSM-IV TR ) y los niveles de mediadores plasmáticos pro-inflamatorios. Los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , fractalquina y SDF-1 presentaron una correlación positiva con los criterios de abuso y dependencia DSM-IV TR . Los sujetos abstinentes a cocaína con más síntomas de gravedad muestran un claro incremento de prevalencia de trastornos comórbidos. Además, se encontró un incremento de los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$  en consumidores de cocaína diagnosticados de trastornos comórbidos, principalmente de personalidad, en relación a los no diagnosticados. Estas proteínas permiten diferenciar la población en dos subgrupos basado en criterios de intensidad de la adicción.

Por otro lado, hemos observado diferencias significativas entre estos subgrupos con respecto a la prevalencia de trastornos psicopatológicos comórbidos. Este efecto de disminución en los niveles plasmáticos de citoquinas y quemoquinas, principalmente los de elevada gravedad de la adicción puede ser debido a los efectos compensatorios tras un elevado incremento producido bajo el consumo de la cocaína, aunque los consumidores severos pueden alcanzar un estado de no respuesta de los mediadores pro-inflamatorios, incrementando el riesgo de desarrollo de trastorno psicopatológicos comórbidos. Nuestras observaciones son consistentes

en relación a estudios previos en sujetos dependientes de cocaína, que muestran un decremento de la capacidad de expresar citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en monocitos (Irwin et al. 2007). El hecho de que presenten más comorbilidad psicopatológica puede deberse a la vulnerabilidad que se crea en un estado alterado de respuesta inmunitaria, como el que planteamos en nuestra hipótesis de descenso de los niveles de citoquinas por efecto compensatorio. Baste como ejemplo, los estudios previos en humanos que mostraron que en individuos sanos a los que se inyectaron inductores de citoquinas como el lipopolisacárido bacteriano se observaron aumentos agudos de los síntomas de depresión y ansiedad (Reichenberg et al. 2001). Por lo tanto, el momento de sobreactivación del sistema inmunológico podría ser un punto de extremada vulnerabilidad al desarrollo de trastornos comórbidos, si tenemos en cuenta que la neuroinflamación puede afectar los procesos de plasticidad cerebral. De hecho, se cree que la activación de las vías inflamatorias dentro del cerebro contribuye a la confluencia de la disminución del soporte neurotrópico y la alteración de la liberación/recaptación de glutamato, lo que añadido a una inducción de estrés oxidativo, daría lugar a citotoxicidad y la pérdida de los elementos gliales, lo que coincide con los hallazgos neuroanatomopatológicos que caracterizan los trastornos depresivos (Miller et al 2015). En los resultados podemos observar la elevada comorbilidad psiquiátrica derivada de estados patogénicos de consumo de cocaína en nuestros sujetos sometidos a estudio.

Respecto al modelo animal, la administración repetida de cocaína, induce un descenso significativo del número de leucocitos y linfocitos (Jankowski et al. 2010), alterando la función de las células T, *natural killers*, neutrófilos y macrófagos, afectando a su capacidad de secretar citoquinas inmunorreguladoras (Baldwin, Roth & Tashkin 1998). Estos resultados fueron probados en modelo animal, para ello evaluamos los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , CX3CL1 (fractalquina en humanos) y SDF-1, las cuales estaban alteradas en sujetos en relación a su sintomatología de gravedad en ratones tratados con cocaína, en los que también se encontraron cambios inducidos por estos psicoestimulantes. TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1 fueron excluidos del estudio en animales, porque estaban inalterados respecto a la intensidad de la adicción en humanos, aunque esta exclusión no significa que estas señales no posean relevantes acciones en el cerebro. Destacar, que la administración repetida de cocaína, reduce los niveles basales de CX3CL1. En ratones, como se observó también en pacientes consumidores en tratamiento.

Hemos hipotetizado que una excesiva y prolongada activación derivada de cambios en los niveles de citoquinas y quemoquinas del SNC, que podría ocurrir durante un consumo patológico de cocaína, puede derivar en anormalidades patológicas relacionadas con la disminución de soporte neurotrófico, decremento de neurogénesis, estrés oxidativo, inducción a la apoptosis, y desregulación de las interacciones gliales/ neuronales y funciones cognitivas. De hecho, recientes estudios indican la existencia de alteraciones inducidas por citoquinas en los procesos de remodelación sináptica afectando a la morfología de las conexiones (por ejemplo forma y distribución de las espinas dendríticas) en las neuronas (Boulanger 2009; Paolicelli et al. 2011). Además, estos mediadores pueden modular la actividad dopaminérgica directamente, modificando neuroadaptaciones asociadas al comportamiento relacionado con la exposición a cocaína (Guyon et al. 2009; Trecki & Unterwald 2009; Trocello et al. 2011). Estos hallazgos han promovido el desarrollo de múltiples

estudios enfocados a la identificación de la dinámica de estos mediadores pro-inflamatorios en los ciclos de la adicción.

Dado que IL-1 $\beta$ , fractalquina y SDF-1 se asocian a los grados de intensidad de adicción a cocaína, sus alteraciones pueden contribuir al riesgo o vulnerabilidad para el desarrollo de trastornos psiquiátricos comórbidos. Como es sabido, la exposición a cocaína incrementa IL-1 $\beta$  en el núcleo accumbens y cortex, habiendo mostrado estar directamente involucrada en alteraciones psiquiátricas como ansiedad y trastornos por estado de ánimo en modelo animal (Cearley et al. 2011; Rossi et al. 2012). De hecho, los consumidores de cocaína, con trastornos psiquiátricos comórbidos, incluyendo trastornos del estado de ánimo, ansiedad, psicosis, trastorno límite y antisocial de la personalidad, mostraron un incremento en los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , en comparación con consumidores sin trastornos comórbidos.

Por otro lado, se ha observado que la fractalquina está involucrada también en trastornos del estado de ánimo, incluyendo depresión, a través de la inhibición de 5-HT por el incremento de la sensibilidad de la entrada de GABA en el núcleo dorsal del rafe (Heinisch & Kirby 2009). Además, es necesaria para la regulación de funciones de la microglia en el mantenimiento homeostático de la sinapsis; como ejemplo, los ratones carentes de su receptor CX3CR1 muestran una deficiencia en la poda sináptica que se traduce en un exceso de espinas dendríticas y sinapsis inmaduras (Paolicelli et al. 2011). En nuestro estudio aunque hemos observado un incremento de los niveles de fractalquina en consumidores con mayor gravedad de adicción a cocaína, este no es significativo en relación con trastornos comórbidos específicos asociados a la misma. Un estudio piloto que hemos realizado en animales de laboratorio carentes del receptor de fractalquina nos ha revelado que la extinción de los condicionamientos espaciales inducidas por cocaína está alterada en los animales carentes de este receptor. Estos animales extinguen el condicionamiento con dificultad, lo que traducido a pacientes humanos podría suponer la existencia de un papel de esta quemoquina como elemento fundamental del olvido de los condicionamientos impuestos por la droga. Estos condicionamientos son la base de los procesos de recaída, piedra angular de la terapéutica de la adicción.

En modelo animal, comparable a la CX3CL1, la SDF-1 fue relacionada con un incremento de actividad gabaérgica y glutamatergica en neuronas 5-HT en el núcleo dorsal del rafe en ratas en contexto de depresión (Heinisch & Kirby 2010). Por lo tanto, estas proteínas están envueltas en el desarrollo de trastornos psiquiátricos como depresión y ansiedad, y probablemente con la elevada prevalencia de trastornos comórbidos en consumidores severos de cocaína estará asociada con niveles alterados de estos mediadores.

En resumen, en este estudio hemos mostrado que los niveles plasmáticos de citoquinas y quemoquinas podrían considerarse implicados en procesos de desarrollo de adicción y consecuencias de consumo patológico de cocaína, así como de síntomas de gravedad. Estos mediadores pro-inflamatorios permiten la diferenciación de sujetos según su grado de gravedad de consumo de cocaína, pudiendo explicar el incremento de vulnerabilidad a comorbilidad psicopatológica. De hecho, citoquinas como la IL-1 $\beta$  se encontraban alteradas en sujetos con trastornos comórbidos. Estos datos son de gran importancia a la hora de entender el proceso de la adicción a cocaína desde un enfoque más holístico y por lo tanto ponen de

manifiesto la necesidad de crear nuevos enfoques de tratamiento más integrales, poniendo énfasis en el tratamiento de estas deficiencias en el sistema inmunológico y de forma más específica en el daño en los sistemas de mediadores alterados. Es necesario continuar en el estudio de esta línea y la búsqueda de tratamientos que restauren el equilibrio del sistema inmune y homeostático natural del individuo, evitando llegar a un estado de vulnerabilidad de desarrollo de otras patologías.

## **Estudio II. Perfil plasmático de factores de crecimiento en usuarios de cocaína en abstinencia: Influencia de la gravedad de adicción y comorbilidad psiquiátrica**

El segundo estudio se plantea a partir de la necesidad de valorar otros mediadores implicados en el proceso de la adicción a cocaína que actúan directamente en procesos de neurogénesis, plasticidad neuronal, sinaptogenesis y apoptosis, así como para valorar la afectación de diferentes grupos moleculares ante la exposición a unas condiciones patológicas comunes. Los resultados fueron negativos, corroborando que no todas las moléculas se encuentran afectadas en relación a consumo y gravedad de la adicción a cocaína. Los resultados mostraron que las concentraciones plasmáticas de BDNF e IGF-1 estaban inalteradas por el consumo patológico en consumidores de cocaína en abstinencia bajo tratamiento. De hecho, las concentraciones plasmáticas de estos factores no se modificaron por el tiempo de abstinencia, duración del consumo o síntomas de gravedad de la adicción a cocaína. La asociación de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 con la edad no se vio afectada por el consumo patológico de cocaína, aunque la asociación entre IGF-1 e IGFBP-3 no fue significativa tras la corrección en consumidores de cocaína en abstinencia. Además, las correlaciones entre concentraciones de BDNF con quemoquinas y aciletanolamidas en el grupo control no fueron observadas en el grupo de cocaína. No obstante, detectamos una correlación positiva entre las concentraciones de IGFBP-3 y SEA en el grupo de cocaína. Por otro lado, encontramos una elevada prevalencia de trastornos psiquiátricos comórbidos en estos pacientes con policonsumo de sustancias y cambios en las concentraciones plasmáticas de BDNF relacionadas con diagnóstico de trastorno de estado de ánimo y ansiedad. Por lo tanto, las concentraciones plasmáticas de BDNF se vieron disminuidas en consumidores de cocaína diagnosticados de trastornos de estado de ánimo y ansiedad primarios e inducidos por cocaína.

Respecto a las concentraciones de BDNF en consumidores abstinentes, aunque no encontramos cambios en las concentraciones, han sido múltiples los estudios clínicos que si han mostrado cambios en las concentraciones plasmáticas de BDNF en sujetos dependientes a cocaína en estado de abstinencia (D'Sa et al. 2011; Corominas-Roso et al. 2013). Sugiriendo que el BDNF podría ser un marcador biológico fiable de adicción. Citando un primer estudio en sujetos dependientes a cocaína, el cual encontró que las concentraciones de BDNF estaban incrementadas durante la abstinencia temprana, siendo la elevación de las concentraciones plasmáticas de BDNF predictor de riesgo de recaída durante la rehabilitación de dependencia a cocaína (D'Sa et al. 2011). Relacionado con estos hallazgos, otro estudio mostro que las concentraciones de BDNF estaban correlacionadas positivamente con el ansia (*craving*) por la cocaína y los síntomas de abstinencia (Corominas-Roso et al. 2013). De modo similar, estudios más recientes en dependientes de crack cocaína encontraron elevadas concentraciones de BDNF durante la abstinencia temprana (Viola et al. 2014) y correlaciones negativas con

gravedad (Sordi et al. 2014) y cantidad de cocaína consumida (Von Diemen et al. 2014). Todos estos estudios prospectivos se realizaron con adictos a cocaína siguiendo tratamientos de desintoxicación durante las primeras 2-4 semanas, a diferencia de nuestro estudio que es un estudio de corte transversal en sujetos consumidores de cocaína que están en tratamiento en centros de programas ambulatorios y que llevan un mínimo de 30 días de abstinencia. Consecuentemente, hemos obtenido una única medida de concentraciones de BDNF para cada participante consumidor de cocaína, los periodos de abstinencia eran variables y los factores ambientales incontrollables (como característica de un tratamiento ambulatorio) los cuales podrían interferir con los resultados.

Respecto a los datos de concentraciones plasmáticas de IGF-1 y IGFBP-3 en consumidores abstinentes a cocaína; numerosos estudios han mostrado que las concentraciones de IGF-1 se ven disminuidas con el avance de la edad, mostrando asociación de IGF-1 con la longevidad y las enfermedades relacionadas con la edad, como por ejemplo, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Bao et al. 2014; Junnila et al. 2013; Muller et al. 2012). En primer lugar hemos verificado que las concentraciones de IGF-1 correlacionan significativamente con la edad de los participantes. Como resultado de estudio, el historial de consumo patológico de cocaína no influye sobre la asociación de concentraciones de IGF-1 y la edad, porque la correlación es significativa y negativa entre ambas variables e idéntica en el grupo control. No obstante, no hemos evaluado el deterioro cognitivo en la muestra de pacientes, algo que si podría correlacionar con los niveles de este factor trófico (Aleman & Torres-Aleman 2009). En relación a los efectos de la adicción a cocaína, no hemos observado cambios en las concentraciones plasmáticas de IGF-1 y IGFBP-3 en consumidores en abstinencia y las concentraciones no correlacionan con variables relacionadas con adicción como síntomas de gravedad a cocaína, abstinencia y duración de consumo de cocaína. No existe mucha literatura sobre asociación entre IGF-1 y cocaína pero si en relación a otras drogas de abuso investigadas. Estudios en ratón sugieren que las concentraciones de IGF-1 están alteradas en áreas cerebrales relacionadas con el desarrollo de la adicción tras la exposición crónica a morfina (Hashiguchi et al. 1996; Beitner-Johnson et al. 1993). En humanos, un estudio reciente en pacientes con dependencia de opioides demostró que las concentraciones en suero de IGF-1 se encontraban elevadas (Reece 2013). Además sobre opioides, varios estudios evaluaron IGF-1 fueron realizados en sujetos dependientes de alcohol, pero los autores no observaron ninguna interacción entre adicción al alcohol y estos péptidos en sangre o cerebro (Stouthart et al. 2003; Leggio et al. 2008). En cambio, un reciente estudio en pacientes dependientes de alcohol encontró que la IGF-1 podría tener un importante papel en las funciones cognitivas en estos sujetos (Han et al. 2014). No se encontró ninguna asociación significativa con marcadores biológicos de adicción a cocaína. La falta de influencia de la adicción a cocaína sobre las concentraciones plasmáticas de BDNF e IGF-1 fue confirmada a través de múltiples análisis de coeficientes de relación de estos factores con otras moléculas circulantes sensibles a la adicción a cocaína y/o comorbilidad psiquiátrica en sujetos abstinentes a cocaína de estudios observacionales similares (Araos et al. 2014; Pavon et al. 2013). Las concentraciones de quemoquinas y mediadores pro-inflamatorios estaban afectadas por los síntomas de gravedad de adicción a cocaína, mientras derivados de ácidos grasos pro-inflamatorios como los endocannabinoides y su congéneres estaban afectados por el historial de consumo patológico de cocaína y la



presencia de trastornos comórbidos. De hecho, las correlaciones significativas entre las moléculas sensibles a cocaína y BDNF e IGF-1 (y IGFBP-3) en controles no se encontraron en el grupo de cocaína. Sin embargo, hemos observado solo una correlación significativa después de múltiples comparaciones en el grupo de cocaína, en concreto en las concentraciones de IGFBP-3 y SEA, pero las concentraciones de SEA no se ven afectadas por el consumo de cocaína, al contrario que otras acetilanolamidas (Pavon et al, 2013). Dado que IGF-1 conforma un complejo ternario con IGFBP-3 (Hall et al. 1999), también hemos estudiado la asociación entre ambos péptidos. Detectando una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de IGF-1 e IGFBP-3 en los participantes controles, pero dicha asociación estaba débilmente afectada por el consumo patológico de cocaína a lo largo de la vida. También analizamos la relación entre BDNF e IGF-1 en usuarios abstinentes con trastornos psiquiátricos comórbidos. En similares estudios previos de corte transversal en consumidores abstinentes de cocaína reclutados en centros con programas ambulatorios, habíamos detectado una elevada prevalencia de comorbilidad psiquiátrica, aproximadamente del 60% (Araos et al. 2014; Pavon et al. 2013). Aunque las concentraciones plasmáticas de estos péptidos estaban inalterados en consumidores de cocaína, examinamos estas concentraciones de acuerdo al diagnóstico de trastornos primarios e inducidos por cocaína. Existe gran evidencia científica que indica que los factores de crecimiento neurotrófico tales como BDNF e IGF-1 están involucrados en la patogénesis de trastornos psiquiátricos comunes. También hemos observado en este estudio cambios en las concentraciones plasmáticas de estos factores neurotróficos en trastornos del estado de ánimo y de ansiedad, especialmente en BDNF. Estudiando la relación entre BDNF y comorbilidad psiquiátrica, la literatura actual está particularmente focalizada en depresión y trastorno bipolar. De hecho, las concentraciones circulantes de BDNF están disminuidas en pacientes depresivos en comparación con controles y estos se incrementan significativamente con tratamientos para depresión (Brunoni et al. 2008; Bocchio-Chiavetto et al. 2010; Piccinni et al. 2008). La reducción de las concentraciones plasmáticas de BDNF ha sido relacionada con trastorno bipolar y se ha encontrado una asociación significativa con la gravedad de la depresión (Rosa et al. 2014; Kenna et al. 2014), sugiriendo que las concentraciones plasmáticas de BDNF pueden ser un marcador de depresión y/o trastorno bipolar. Nuestros estudios son consistentes con la literatura sobre las concentraciones de BDNF porque en consumidores de cocaína diagnosticados con trastorno de ánimo, primario e inducido por cocaína, se encontraron disminuidos. De todas formas, solo 5 consumidores de cocaína fueron identificados con este diagnóstico y por lo tanto, la significancia estadística de esta disminución está cuestionada. No hemos observado diferencias en las concentraciones de BDNF en estos sujetos en abstinencia, mostrando trastorno de estado de ánimo primario o trastorno del estado de ánimo inducido por cocaína por separado. En la literatura, BDNF se plantea como un potencial marcador biológico de ansiedad para estudios preclínicos en modelo animal (Martinowich et al. 2007). Estudios traslacionales han mostrado que un estrés temprano correlaciona negativamente con las concentraciones de BDNF periféricas en la vida posterior (Dalle Molle et al. 2012). Una revisión de estudios clínicos recientes mostró que las concentraciones de BDNF eran más bajas en individuos con algún trastorno de ansiedad comparado con individuos sin trastorno de ansiedad, pero no son datos consistentes en toda la literatura (Suliman et al. 2013). En los resultados de este estudio, los consumidores de cocaína en abstinencia diagnosticados con ambos trastornos de ansiedad, primario e inducido por cocaína, mostraron una disminución significativa de BDNF en plasma, como se vio

anteriormente con trastornos del estado de ánimo. De nuevo, la principal limitación de estas observaciones está relacionada con el reducido número de individuos con este diagnóstico comórbido dual (trastorno de ansiedad primario e inducido por cocaína). Por último, se estudió la relación entre IGF-1 y comorbilidad psiquiátrica; Múltiples estudios en población adulta y joven han mostrado la asociación entre concentraciones de IGF1 y síntomas depresivos (Lin et al. 2014; Stouthart et al. 2003). Esto ha sido mostrado en concentraciones plasmáticas de IGF1 incrementadas en pacientes depresivos agudos (Deuschle et al. 1997) y de forma similar, otro estudio demostró que pacientes con trastorno bipolar presentaban concentraciones de IGF1 elevadas (Liu et al. 2014). Aunque nuestros datos son consistentes con estas observaciones y los consumidores de cocaína con trastorno de ánimo primario mostraron un incremento en concentraciones plasmáticas de IGF1 e IGFBP-3, estos incrementos no mostraron significancia estadística relativa al grupo control y consumidores abstinentes sin trastorno del estado de ánimo.

Por otro lado, nos planteamos que múltiples estudios y evidencia científica muestran el efecto de los procesos de desarrollo de la adicción sobre las concentraciones plasmáticas periféricas de mediadores del sistema inmune, así como derivados de ácidos grasos del sistema endocannabinoide y congéneres. Pero revisando bibliografía, poco se ha publicado sobre la influencia del sexo sobre tales efectos. Destacando la complejidad de su estudio, dada la interacción de los ciclos biológicos femeninos, así como los factores sociales limitantes, como el hecho de que la población femenina que solicita tratamiento en centros públicos es muy baja, como indicamos previamente (EMCDDA 2014). Dadas varias observaciones en los primeros estudios sobre la posible influencia del sexo en los parámetros estudiados, planteamos un tercer estudio basado en el factor sexo.

### **Estudio III. Diferencias sexuales sobre biomarcadores de adicción a cocaína y comorbilidad psicopatológica en usuarios adictos en abstinencia.**

Al plantear un estudio de diferentes parámetros biológicos y su alteración bajo unas condiciones comunes, de adicción a cocaína, se presenta la necesidad de valorar diferencias individuales que afectan directamente a tales parámetros y que dada su complejidad no se suelen tener en cuenta en el ámbito del diseño del estudio. Uno de estos factores minusvalorado con frecuencia es el sexo. En este estudio se plantea la afectación del sexo sobre los posibles marcadores biológicos de adicción a cocaína. Los resultados muestran el relevante papel del sexo como factor modulador de la presencia de trastornos psiquiátricos comórbidos y Trastornos por uso de sustancias (TUS) en sujetos con trastorno por uso de cocaína a lo largo de la vida. Como se refleja en la bibliografía y se corroboró en el proceso de reclutamiento, los hombres solicitan más tratamiento por adicción a cocaína que las mujeres. Destaca que los hombres adictos a cocaína en abstinencia se caracterizan por unas tasas más elevadas de TUS a otras sustancias como el alcohol y la marihuana que las mujeres. En cambio las mujeres adictas muestran una elevada prevalencia de trastornos mentales comórbidos, como trastornos de estado de ánimo, ansiedad y trastorno psicótico. Dado que la presentación clínica era dependiente del sexo del paciente, no fue sorprendente constatar que las concentraciones plasmáticas de posibles marcadores biológicos de adicción a cocaína y comorbilidad psiquiátrica estaban influidas por el sexo. En este estudio se examinaron las diferencias sexuales en mediadores inflamatorios y derivados de ácidos grasos dado que esas



moléculas estaban afectadas por consumo patológico de cocaína en los anteriores resultados (Pavon et al. 2013; Araos et al. 2014). Los hallazgos más relevantes fueron que todas las citoquinas inflamatorias evaluadas y la aciletanolamida POEA se encontraron alterados diferencialmente en mujeres adictas a cocaína, ampliando la influencia del sexo a los posibles marcador biológicos para adicción a cocaína. Por otro lado cabe destacar que las concentraciones plasmáticas de otros dos mediadores lipídicos, SEA y 2-LG estaban asociadas con comorbilidad psiquiátrica en sujetos adictos a cocaína.

Estas diferencias se basan en la diferencia fisiología de hombres y mujeres. En las últimas décadas se han hallado evidencias que demuestran como de forma natural se dan diferencias según el sexo en la respuesta del sistema inmunológico y los mediadores inflamatorios. Durante los años reproductivos, las mujeres tienen más respuesta celular inmunológica que los hombres (Schuurs & Verhul. 1990). De hecho, las fluctuaciones de niveles de estrógenos pueden alterar las funciones inmunológicas celulares afectando a la producción de citoquinas y quemoquinas (Kovacs & Messingham 2002). Además, recientes estudios han mostrado la relación entre los niveles de mediadores inflamatorios en sangre y líquido cefalorraquídeo en adictos a sustancias de abuso, como el alcohol, psicoestimulantes y opiáceos (Coller & Hutchinson 2012). Por todo ello, nuestro objetivo era valorar la afectación del sexo. Por lo tanto, se analizaron también las concentraciones de quemoquinas en relación al sexo. Las concentraciones de MCP1 y la SDF-1 se encontraron disminuidas en ambos, hombres y mujeres adictos a cocaína. Estos cambios en quemoquinas circulantes están en concordancia con los resultados del primer estudio en sujetos adictos a cocaína en abstinencia, los cuales sugieren que estas quemoquinas son marcadores biológicos de uso patológico de cocaína, aunque no se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de fractalquina. Por otra parte, no hemos detectado diferencias en las concentraciones plasmáticas de estas citoquinas por sexo. Además de las quemoquinas, evaluamos las concentraciones de citoquinas en plasma, incluyendo mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. En este caso, encontramos un claro dimorfismo en las concentraciones circulantes de todas las citoquinas evaluadas. Las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, y TNF $\alpha$  fueron más elevadas en las mujeres sanas en comparación con los hombres. Destacar, que estas diferencias no se mostraron en sujetos con diagnóstico de trastorno por uso de cocaína a lo largo de la vida. Destacar que los sujetos diagnosticados con trastorno por uso de cocaína a lo largo de la vida mostraron tasas más elevadas de trastorno mental y otros TUS, como se muestra en los estudios previos con los sujetos adictos a cocaína en abstinencia (Herrero et al. 2007; Araos et al. 2014; Fattore et al. 2008), y se observaron diferencias en la prevalencia de trastornos psiquiátricos de acuerdo al sexo. Múltiples estudios epidemiológicos han mostrado diferencias significativas respecto al sexo entre sujetos diagnosticados con trastorno por estado de ánimo y ansiedad. La incidencia de trastorno mental es elevada en mujeres respecto a hombres, específicamente en periodos concretos de la vida como el embarazo, la maternidad, menopausia, o tras eventos traumáticos (Fernandez-Guasti et al 2012), ante los cuales las mujeres son más sensibles. Estas prevalencias elevadas de trastorno psiquiátrico a lo largo de la vida en mujeres han sido mostradas con TUS (Greenfield et al. 2010; Conway et al. 2006). De acuerdo con la bibliografía sobre el tema, en nuestro estudio se muestra una elevada prevalencia de trastorno psiquiátrico comórbidos a trastorno por uso de cocaína en mujeres, en orden de más prevalencia; trastorno por estado de ánimo, ansiedad y psicosis. Mientras

que las tasas de TUS comórbidos para otras sustancias, especialmente alcohol, fueron más elevados en hombres adictos a cocaína. Es interesante destacar, que no se observaron otras diferencias en relación al patrón de consumo, respecto a tiempo de abstinencia, tiempo de consumo de cocaína o gravedad del consumo; no se mostraron diferencias significativas en relación al sexo. Todos estos hallazgos sugieren que cualquier posible marcador biológico para adicción a cocaína y comorbilidad psiquiátrica estará influido por el sexo. Por lo tanto, el tratamiento debería especializarse teniendo en cuenta estas diferencias.

En relación al efecto de otras sustancias en patrón de consumo crónico, estudios previos han mostrado que la exposición crónica a alcohol o cocaína, suprime las respuestas del sistema inmune. Aunque se han publicado resultados contrarios respecto al alcoholismo. Por ejemplo, mientras se dio un incremento significativo en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF $\alpha$  en alcohólicos crónicos sin enfermedad hepática, los alcohólicos crónicos con enfermedad hepática que continuaban bebiendo alcohol, mostraban una baja producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Achur et al. 2010). Respecto a la cocaína, se ha mostrado que los sujetos dependientes muestran una disminución de la capacidad de expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en monocitos (Irwin et al. 2007). Además, hemos mostrado recientemente que los sujetos adictos a cocaína en abstinencia presentan concentraciones más bajas de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en monocitos (Irwin et al. 2007). Hemos mostrado en el primer estudio que los sujetos adictos a cocaína en abstinencia presentan concentraciones más bajas de TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , las cuales se encuentran afectadas por los síntomas de severidad. Nuestros datos sobre las concentraciones de citoquinas podrían ser derivados de los cambios inducidos por el efecto del consumo de cocaína a largo plazo, pero estos efectos solo se producen en mujeres, sin efecto en hombres. Las concentraciones plasmáticas de citoquinas inflamatorias se mostraron claramente reducidas en mujeres, y dado que esta reducción puede estar asociada con una disminución de la actividad inmunológica y por lo tanto un riesgo de desarrollo de trastornos mentales (Fernandez-guasti et al. 2012; Salim et al. 2012). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de quemoquinas y citoquinas no están asociadas con sexo y psicopatologías comórbidos en sujetos adictos.

Muchas líneas de evidencia sugieren que los lípidos bioactivos, como los endocannabinoides y sus congéneres, en especial las aciletanolamidas, están involucrados en adquisición y mantenimiento de las conductas de consumo de drogas, así como en otros procesos asociados a la adicción (Serrano & Parsons 2011; Bilbao et al. 2013). Sin embargo, todos estos estudios se basan en observaciones preclínicas porque existen pocos estudios referentes a las concentraciones en plasma de derivados lipídicos en sujetos con TUS (Potvin et al. 2008; Desfosses et al. 2012), principalmente con uso de alcohol (Mangieri et al. 2009; Feurecbeck et al. 2012). Los endocannabinoides actúan sobre los receptores cannabinoides para producir sus efectos y se encuentran compuestos por dos tipos estructurales de derivados lipídicos: Aciletanolamidas (ej. AEA) y 2-acilglicerol (ej. 2-AG). Estudios clínicos en consumidores de alcohol han mostrado que los efectos del consumo de alcohol afectan a las concentraciones de endocannabinoides circulantes tras consumo regular y crónico (Mangieri et al. 2009; Feurecker et al. 2012). Respecto al uso de cocaína, mostramos recientemente que las concentraciones de Aciletanolamidas están incrementadas en adictos a cocaína en abstinencia, mientras ambos, 2-AG y 2-LG están reducidos (Pavon et al. 2013). Cabe destacar que los diferentes perfiles de ambos tipos de endocannabinoides (AEA y 2AG) han sido descritos en diferentes áreas

cerebrales tras la administración de sustancias de abuso en roedores (Gonzalez et al. 2002; Caile et al. 2007). De acuerdo con estos estudios, hemos mostrado que las concentraciones plasmáticas de los derivados lipídicos se ven afectadas de forma diferente por el historial de adicción a cocaína. Todas las aciletanolamidas, excepto SEA, se encontraron incrementadas en los sujetos adictos a cocaína, pero los 2-acilgliceroles estaban disminuidos en relación a sujetos sanos. Generalmente, no observamos diferencias sexuales en las concentraciones plasmáticas de derivados de ácidos grasos. Sin embargo, las concentraciones de POEA se encontraban alteradas exclusivamente en mujeres diagnosticadas con TUC. Nuestros datos actuales mostraban marcadamente incrementadas en mujeres adictas a cocaína en abstinencia, y cambios similares habían sido observados previamente en el primer estudio con adictos a cocaína diagnosticados con comorbilidad psiquiátrica de trastornos de estado de ánimo y ansiedad. Se sabe poco acerca de la POEA, pero evidencia científica sugiere que esta regula apetito y el metabolismo de la energía a través de un receptor no endocannabinoide (Lambert & Mucioli 2007; Syed et al 2012). Destacar que la POEA se deriva de un ácido graso denominado ácido palmitoleico, y hay evidencias recientes que sugieren que éste ácido graso está vinculado con anomalías metabólicas (Mozaffarian et al. 2010). De hecho, hemos observado un efecto significativo del IMC sobre las concentraciones de POEA en nuestra muestra, y esta influencia se observa en el grupo de cocaína. Sin embargo, no existen datos que relacionen las concentraciones de POEA en psicopatología y adicción. En este estudio no se observa relación entre las concentraciones de POEA y las variables relacionadas con adicción como tiempo de abstinencia, síntomas de gravedad de cocaína, o diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica, pero el sexo presenta una fuerte asociación con POEA en sujetos adictos a cocaína. Aunque dado el reducido tamaño de la muestra de mujeres no podemos concluir el efecto de los trastornos psicopatológicos comórbidos en las concentraciones de POEA, dado que la prevalencia de trastornos psiquiátricos comórbidos es más elevada en mujeres que en hombres. La asociación entre endocannabinoides circulantes y trastornos mentales ha sido estudiada extensamente en estudios clínicos, concluyendo con la observación común de que en estos trastornos las concentraciones de aciletanolamidas se encontraban elevadas (De Marchi et al. 2003; Schwarz et al. 2011). El incremento de concentraciones de aciletanolamidas ha sido observado en pacientes TUS con comorbilidad psiquiátrica, como esquizofrenia (Potvin et al. 2008). Por lo tanto, se establece una relación entre SEA y diagnóstico de trastornos psiquiátricos comórbidos en usuarios adictos a cocaína, con concentraciones más elevadas en adictos con comorbilidad. No obstante, los endocannabinoides clásicos como AEA y 2-AG no se ven influidos por la presencia de comorbilidad.

Aunque nuestros hallazgos sostienen la importancia de monitorizar los niveles plasmáticos de señales pro-inflamatorias y lípidos bioactivos como los endocannabinoides en el contexto de la complejidad de una enfermedad como es la adicción, somos conscientes de las limitaciones del presente estudio. En primer lugar, la fusión de diagnósticos pasados y presentes a lo largo de la vida, podría tener implicaciones en las citoquinas y quemoquinas, como marcador de previo consumo patológico o marcador de consumo actual. Segundo, sería necesario otro estudio que determinara los niveles de citoquinas y quemoquinas en consumidores activos de cocaína, valorando el efecto producido por la presencia de la cocaína sobre estos factores. Por último, sería necesario probar el valor predictivo del modelo preliminar y discriminativo en una

muestra más amplia e incluir sujetos con historial de trastornos psiquiátricos sin consumo de cocaína. Deberían ser consideradas nuevas estrategias para la investigación, incluidos estudios en modelo animal, para valorar el papel de estos mediadores en cerebro. Por nuestra parte, como estudio preliminar preclínico en modelo animal con ratón, hemos estudiado el efecto de la administración aguda y crónica de cocaína sobre los niveles plasmáticos de tres citoquinas/quemoquinas predictoras de gravedad en humanos. Los datos obtenidos sugieren que estas moléculas pueden ser moduladas por cocaína, y que los niveles de CX3CL1 y SDF-1 se ven incrementados por la administración repetida en comparación con administración aguda. Este efecto adaptativo fue más pronunciado en el caso de la CX3CL1, los niveles de esta quemoquina fueron agudamente inhibidos por la cocaína en la primera exposición, manteniéndose bajos durante 24 horas tras seis inyecciones de cocaína, pero fuertemente disminuidos cuando la cocaína fue re-inyectada (60, 120 y 240 minutos tras la última inyección). Dado que estas citoquinas parecen ser esenciales para la activación de la microglia, pruning de dendritas y neurogénesis (Paolicelli et al. 2011; Stuart & Baune 2014; Stuart et al. 2014), es factible intuir que estos cambios contribuyen al desarrollo de neuroadaptaciones relacionadas con la adicción. Son necesarios más estudios en modelo animal de autoadministración de cocaína, con extinción y recaída, o en modelo de escalada. A partir de nuestros resultados, creemos que la monitorización de los niveles de citoquinas y quemoquinas podría ayudar a valorar el estado del sujeto y entender la compleja dinámica del desorden sistémico denominado adicción, teniendo en cuenta la relación con trastornos comórbidos asociados. Nuestro estudio analiza, el perfil de citoquinas/quemoquinas ante un consumo patológico de cocaína, pero es necesario el estudio del efecto de un uso recreacional o en estado activo de cocaína sobre estos mediadores. Así como la influencia del sexo en una muestra más amplia. Por otro lado, necesitamos realizar estudios adicionales para establecer los mecanismos de acción de estos factores tróficos (especialmente BDNF) y estudiar de forma selectiva la influencia de cada factor para cada trastorno psiquiátrico comórbido en adicción a cocaína.

Y sobre todo, una vez identificada la alteración de los niveles de estas moléculas como parte del proceso de desarrollo de la adicción a cocaína y su papel en la vulnerabilidad al desarrollo de comorbilidad psiquiátrica asociada, se debe utilizar esta información para mejorar la comprensión de la enfermedad adictiva y sus complicaciones psiquiátricas. Se debe focalizar el esfuerzo científico hacia nuevas formas de tratamiento que faciliten la reinstauración de un estado saludable del individuo, desde un nuevo enfoque completamente diferente al actual, centrado en tratamientos integrales y holísticos que parten del conocimiento de la importancia de un sistema inmunológico sano y fuerte, así como de la integridad de otros sistemas moduladores asociados (factores de crecimiento, lípidos bioactivos, etc...) que puedan verse alterados en el proceso de la adicción

## VI. CONCLUSIONES DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- I. La medición objetiva de moléculas circulantes en el plasma de pacientes con trastorno por uso de sustancias puede ayudar a identificar candidatos a biomarcadores tanto de consumo patológico como de algunos aspectos específicos de dicho trastorno como su gravedad, asociación a patología psiquiátrica o sesgo de sexo.
- II. De modo más específico, las concentraciones plasmáticas de mediadores pro-inflamatorios se encuentran alteradas en usuarios de cocaína en abstinencia tras un uso patológico. De entre estas moléculas, destacan  $\text{TNF}\alpha$ , MCP-1 y SDF-1 con diferentes concentraciones plasmáticas en usuarios de cocaína en relación a controles sanos, y por otro lado IL-1 $\beta$ , fractalquina y SDF-1 que correlacionan positivamente con criterios de gravedad de abuso y dependencia (DSM-IV TR) de cocaína.
- III. El uso patológico de cocaína no influye en la concentración plasmática de los factores de crecimiento BDNF e IGF-1 y la proteína vinculada IGFBP-3. Sin embargo, sí se encuentra disminuida la concentración de BDNF en usuarios de cocaína diagnosticados con trastornos de estado de ánimo y ansiedad, primarios e inducidos.
- IV. El sexo es determinante para el estudio de los posibles marcadores biológicos de adicción a cocaína y la presencia de comorbilidad psicopatológica. En la población estudiada, las mujeres adictas a cocaína presentan mayores prevalencias de trastornos psiquiátricos (estado de ánimo, ansiedad y psicosis) y los hombres muestran más comorbilidad de trastornos por uso a otras sustancias de abuso.
- V. El sexo es determinante sobre las concentraciones plasmáticas de mediadores inflamatorios y determinados derivados de ácidos grasos. Según el sexo se han encontrado diferencias en las concentraciones de citoquinas (pro y anti-inflamatorios: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y  $\text{TNF}\alpha$ ) y determinados derivados de ácidos grasos, como la aciletanolamida POEA, que se encontraba incrementada específicamente en mujeres adictas.

## VII. ANEXO. Publicaciones científicas

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha colaborado en la realización de los siguientes trabajos de los que se derivaron las siguientes publicaciones:

1. Pavón FJ1, Araos P, Pastor A, Calado M, **Pedraz M**, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Serrano A, Blanco E, Rivera P, Suárez J, Romero-Cuevas M, Pujadas M, Vergara-Moragues E, Gornemann I, Torrens M, de la Torre R, Rodríguez de Fonseca F (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 18(6):955-69.
2. Orio L1, Pavón FJ, Blanco E, Serrano A, Araos P, **Pedraz M**, Rivera P, Calado M, Suárez J, de Fonseca FR (2013). Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr Pharm Des.* 19(40):7036-49.
3. Araos P, Vergara-Moragues E, **Pedraz M**, Pavón FJ, Campos Cloute R, Calado M, Ruiz JJ, García-Marchena N, Gornemann I, Torrens M, Rodríguez de Fonseca F. (2014). Comorbilidad Psicopatologica en usuarios de cocaína en tratamiento ambulatorio. *Adicciones.* 26(1):15-26.
4. Castilla-Ortega E1, Blanco E, Serrano A, Ladrón de Guevara-Miranda D, **Pedraz M**, Estivill-Torrús G, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ (2015). Pharmacological reduction of adult hippocampal neurogenesis modifies functional brain circuits in mice exposed to a cocaine conditioned place preference paradigm. *Addict Biol.* 2015 Apr 14. doi: 10.1111/adb.12248. [Epub ahead of print]

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Achur RN, Freeman WM, Vrana KE (2010) Circulating cytokines as biomarkers of Alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol.* 5:83–91.
2. Aleman A, Torres-Aleman I (2009) Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog Neurobiol.* 89: 256–265.
3. Amato L, Minozzi S, Pani, PP, Davoli M (2007). Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* Jul 18; (3): CD006306.
4. Amato L, Minozzi S., Pani PP, Solimini R, Vecchi S, Zuccaro P, Davoli M (2011). Dopamine agonists for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* Dec 7; (12):CD003352..CD00352.pub3.and compulsive alcohol use. *Addiction*, 95 (supl. 2), 145-153.
5. Andersen ML, Sawyer EK, Howell LL (2012) Contributions of neuroimaging to understanding sex differences in cocaine abuse. *Exp Clin Psychopharmacol.* 20:2–15.
6. American Psychiatric Association (1981). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* 3.<sup>a</sup> ed. Revised (DSM-III). Washington DC: American Psychiatric Association.
7. American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Edition, Text Revision. Washington, DC.
8. Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavon FJ, Campos Cloute R, Calado M, et al (2014); [Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment]. *Adicciones.* 26: 15–26. PMID: 24652395.
9. Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavon FJ, Campos Cloute R, Calado M, Ruiz JJ, Garcia-Marchena N, Gornemann I, Torrens M, Rodriguez de Fonseca F (2014) [Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment]. *Adicciones* 26:15-26.
10. Arias F, Szerman N, Vega P, Mesías B, Basurte I, Morant C, Ochoa E, Poyo F, Babin F (2012). Abuso o dependencia a la cocaína y otros trastornos psiquiátricos. Estudio Madrid sobre la prevalencia de la patología dual. *Rev Psiquiatr Salud Ment* S1888-9891 (12)00185-1.
11. Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C (2011) Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 32:2030–2044.
12. Back SE, Dansky BS, Carroll KM, Foa EB, Brady KT (2001) Exposure therapy in the treatment of PTSD among cocaine-dependent individuals: description of procedures. *J Subst Abuse Treat.* 21(1):35-45.
13. Back SE, Brady KT, Jackson JL, Salstrom S, Zinzow H (2005) Gender differences in stress reactivity among cocaine-dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* 180:169-176.
14. Baigent M, Holme G, Hafner RJ (1995) Self reports of the interaction between substance abuse and schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry.* 29:69-74.
15. Baldwin GC, Roth MD, Tashkin DP (1998) Acute and chronic effects of cocaine on the immune system and the possible link to AIDS. *J Neuroimmunol* 83:133–138.
16. Bao Q, Pan J, Qi H, Wang L, Qian H, Jiang F, et al (2014) Aging and age-related diseases—From endocrine therapy to target therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 394: 115–118.

17. Barkley RA, Gordon M (2002) Research on comorbidity, adaptative functioning, and cognitive impairments in adults with ADHD: implication for a clinical practice. En: Goldstein S, Ellison AT (eds). *Clinician's guide to adult ADHD: assessment and intervention*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 43-69.
18. Batel P (2000) Addition and schizophrenia. *Eur Psychiatry*. 15:115-22.
19. Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF (2003) Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*. 121(4):847-53.
20. Becker JB, Hu M (2008) Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 29:36-47.
21. Beitner-Johnson D, Nestler EJ (1993) Chronic morphine decreases insulin-like growth factor-I levels in the ventral tegmental area of the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*. 692: 246–248.
22. Ben Menachem-Zidon O, Goshen I, Kreisel T, Ben Menahem Y, Reinhartz E, Ben Hur T, Yirmiya R (2008) Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 33(9):2251-62.
23. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*. 353(1):23-31.
24. Besedovsky HO, del Rey A (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 17(1):64-102.
25. Bhatara V, Loudenberg R, Ellis R (2006) Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten Disord*; 9: 515-22.
26. Biederman J, Wilens TE, Mick E, Milberger S, Spencer TJ, Faraone SV (1995). Psychoactive substance use disorders in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Effects of ADHD and psychiatric comorbidity. *Am J Psychiatry*. 152: 1652-8.
27. Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*; 366: 237-48.
28. Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Spanagel R, Rodriguez de Fonseca F (2013) Oleoylethanolamide dosedependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* 18:78–87.
29. Bobzean SA, DeNobrega AK, Perrotti LI (2014) Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol* 259:64-74.
30. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al (2010) Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry*. 11: 763–773.
31. Borsini A, Hepgul N, Mondelli V, Chalder T, Pariante CM (2014) Childhood stressors in the development of fatigue syndromes: a review of the past 20 years of research. *Psychol Med* 44:1809-1823.
32. Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM (2015) The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci*. 38(3):145-57.



33. Boulanger LM (2009) Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64:93–109.
34. Buckley PF (1998) Substance abuse in schizophrenia: a review. *J Clin Psychiatry*. 1998; 59 Suppl 3:26-30.
35. Brady KT, Sinha R (2005) Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. *Am J Psychiatry*. 2005; 162: 1483-93.4.
36. Brady KT, Dansky BS, Back SE, Foa EB, Carroll KM (2001) Exposure therapy in the treatment of PTSD among cocaine-dependent individuals: preliminary findings. *J Subst Abuse Treat*. Jul;21(1):47-54.
37. Brietzke E, Mansur RB, Soczynska JK, Kapczinski F, Bressan RA, McIntyre RS (2012) Towards a multifactorial approach for prediction of bipolar disorder in at risk populations. *J Affect Disord* 140:82–91.
38. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F (2008) A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 11: 1169–1180.
39. Caille S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH (2007) Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci* 27:3695–3702.
40. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 394(6690):277-81.
41. Calignano A, La Rana G, Piomelli D (2001) Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol*. 419(2-3):191-8.
42. Cami J, Farre M (2003) Drug addiction. *N Engl J Med* 349:975-986.
43. Carpenter LL, Gawuga CE, Tyrka AR, Lee JK, Anderson GM, Price LH (2010) Association between plasma IL-6 response to acute stress and early-life adversity in healthy adults. *Neuropsychopharmacology*. 35(13):2617-23.
44. Castren E (2004) Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol*. 29: 289–302.
45. Cearley CN, Blindheim K, Sorg BA, Krueger JM, Churchill L (2011) Acute cocaine increases interleukin-1 beta mRNA and immunoreactive cells in the cortex and nucleus accumbens. *Neurochem Res* 36:686–692.
46. Charach A, Yeung E, Climans T, Lillie E (2011). Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: comparative meta-analyses. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 50: 9-21.
47. Choi JW, Chun J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*; 1831(1): 20-32.
48. Cipriani R, Villa P, Chece G, Lauro C, Paladini A, Micotti E, Perego C, De Simoni MG, Fredholm BB, Eusebi F, Limatola C (2011) CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. *J Neurosci* 31:16327–16335.
49. Cleck JN, Blendy JA (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest*. 118:454-61.

50. Cline EJ, Scheffel U, Boja JW, Carroll FI, Katz JL, Kuhar MJ.(1992). Behavioral effects of novel cocaine analogs: a comparison with in vivo receptor binding potency. *J Pharmacol Exp Ther.* 260:1174-9.
51. Collier JK, Hutchinson MR (2012) Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther* 134:219–245.
52. Compton WM, Thomas YF, Stinson FS, Grant BF (2007) Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64:566-76.
53. Conway KP, Compton W, Stinson FS, Grant BF (2006) Life time comorbidity of DSM- IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *J Clin Psychiatry* 67:247–57.
54. Corominas-Roso M, Ramos-Quiroga JA, Ribases M, Sanchez-Mora C, Palomar G, Valero S, et al. (2013) Decreased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1–9.
55. Crews FT, Zou J, Qin L (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1:S4-S12.
56. De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V(2003).
57. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis.*2:5.
58. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46–56.
59. Degenhardt L, Singleton J, Calabria B, McLaren J, Kerr T, Mehta S, Kirk G, Hall WD (2011) Mortality among cocaine users: a systematic review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend* 113:88-95.
60. Desfosses J, Stip E, Bentaleb LA, Lipp O, Chiasson JP, Furtos A, Venne K, Kouassi E, Potvin S (2012) Plasma endocannabinoid alterations in individuals with substance use disorder are dependent on the 'mirror effect' of schizophrenia. *Front Psychiatry* 3:85.
61. Deuschle M, Blum WF, Strasburger CJ, Schweiger U, Weber B, Körner A, et al (1997) Insulin-like growth factor- I (IGF-I) plasma concentrations are increased in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology.* 22: 493–503.
62. Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Järbe TU, Eisen MS, Mechoulam R (1992) A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 35(11):2065-9.
63. Di Francesco P, Marini S, Pica F, Favalli C, Tubaro E, Garaci E (1992) In vivo cocaine administration influences lymphokine production and humoral immune response. *Immunol Res* 11:74–79.
64. Diercks DB, Fonarow GC, Kirk JD, Jois-Bilowich P, Hollander JE, Weber JE, Wynne J, Mills RM, Yancy C, Peacock WF, Committee ASA, Investigators (2008) Illicit stimulant use in a United States heart failure population presenting to the emergency department (from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry Emergency Module). *Am J Cardiol* 102:1216-1219.

65. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372(6507):686-91.
66. Di Marzo V, Deutsch DG (1998) Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*. 5(6 Pt B):386-404.
67. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508.
68. Domenici E, Muglia P. (2007) The search for peripheral disease markers in psychiatry by genomic and proteomic approaches. *Expert Opin Med Diagn*. 1: 235–251.
69. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. (2010) Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*. 5: e9166.
70. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):446-57.
71. D'Sa C, Fox HC, Hong AK, Dileone RJ, Sinha R (2011) Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: a prospective study. *Biol Psychiatry*. 70: 706–711.
72. De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN (2001) A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 7:1151–1154.
73. Edward et al (2006) Treating Depression in Substance Abusers. *Current Psychiatry Reports* 2006, Current Science Inc.8: 363-370.
74. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 52(4):595-638.
75. Elkins IJ, McGue M, Iacono WG (2007) Prospective effects of attentional deficit hyperactivity disorder, conduct disorder and gender on adolescent substance use and abuse. *Arch Gen Psychiatry*. 64:1145- 52.
76. EMCDDA. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) (2012) Annual report 2012: the state of the drugs problem in Europe. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2014Euro Surveill. 17:20315.
77. EMCDDA Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) (2014) Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades 2014. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2014.
78. EMCDDA Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) (2015) Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y Novedades 2015. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
79. Falck RS, Wang J, Siegal HA, Carlson RG (2004) The prevalence of psychiatric disorder among a community sample of crack cocaine users: an exploratory study with practical implications. *J Nerv Ment Dis* 192:503-507.
80. Fattore L, Altea S, Fratta W (2008) Sex differences in drug addiction: a review of animal and human studies. *Womens Health (Lond Engl)*. 4:51-65.

81. Feighner JP, Robins E, Guze SB, Woodruff RA Jr, Winokur G, Munoz R. (1972) Diagnostic criteria for use in psychiatric research. *Arch Gen Psychiatry*, 26, 57-63.
82. Fensterl V, Sen GC (2009) Interferons and viral infections. *Biofactors* 35:14-20.
83. Fernandez-Guasti A, Fiedler JL, HerreraL, HandaRJ (2012) Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Horm Metab Res*. 44:607–18.
84. Fernández-Ruiz J, García C, Sagredo O, Gómez-Ruiz M, de Lago E (2010) The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets*. 14(4):387-404.
85. Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos JA (2010) Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther*. 16(3):e72-91
86. Festa ED, Quinones-Jenab V (2004) Gonadal hormones provide the biological basis for sex differences in behavioral responses to cocaine. *Horm Behav* . 46:509–19.
87. Feurecker M, Hauer D, Gresset T, Lassas S, Kaufmann I, Vogeser M, et al (2012) Effect of an acute consumption of a moderate amount of ethanol on plasma endocannabinoid levels in humans. *Alcohol Alcohol* 47:226–32.
88. First MB, Donovan S, Frances A (1996) Nosology of chronic mood disorders. *Psychiatr Clin North Am* 19:29-39.
89. Fiala M, Gan XH, Zhang L, House SD, Newton T, Graves MC, Shapshak P, Stins M, Kim KS, Witte M, Chang SL (1998) Cocaine enhances monocyte migration across the blood– brain barrier. Cocaine’s connection to AIDS dementia and vasculitis? *Adv Exp Med Biol* 437:199–205.
90. First MB, Gladis MM. (1996). Diagnóstico y diagnóstico diferencial de los trastornos psiquiátricos y por uso de sustancias. En: Solomon J, Zimberg S, Shollar E (Eds). *Diagnóstico Dual*. Primera Ed. Ediciones en Neurociencias. España.
91. First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. (1999). *Entrevista clínica estructurada para los Trastornos del eje I del DSM-IV. Versión clínica*. Barcelona: Masson.
92. Frasure-Smith N, Lespérance F, Irwin MR, Talajic M, Pollock BG (2009) The relationships among heart rate variability, inflammatory markers and depression in coronary heart disease patients. *Brain Behav Immun*. 23(8):1140-7.
93. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature*. 425(6953):90-3.
94. Fuster D, Tsui JJ, Cheng DM, Quinn EK, Armah KA, Nunes D, Freiberg MS, Samet JH (2013) Interleukin-6 is associated with noninvasive markers of liver fibrosis in HIV-infected patients with alcohol problems. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:1110–1116.
95. Giuffrida A, Piomelli D (2000) The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chem Phys Lipids*. 108(1-2):151-8.
96. Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954:73–81.
97. Gual A. (2007). Dual Diagnosis in Spain. *Drug and Alcohol Review*, 26, 65-71.

98. Guyon A, Skrzydelski D, De Giry I, Rovere C, Conductier G, Trocetto JM, Dauge V, Kitabgi P, Rostene W, Nahon JL, Melik Parsadaniantz S (2009) Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* 162:1072–1080.
99. Grant BF (1995) Comorbidity between DSM-IV drug use disorders and major depression: Results of a national survey of adults. *J Subst Abuse*. 7:481-97.
100. Grant BF, Stinson FS, Dawson DA, Chou SP, Dufour MC, Compton W, et al. (2004) Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*. 61:807-16.
101. Green A, Salomon M, Brenner M, Rawlins K. (2002) Treatment of schizophrenia and comorbid substance use disorder. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 1(2):129-39.
102. Greenfield SF, Back SE, Lawson K, Brady KT (2010) Substance abuse in women. *Psychiatr Clin North Am* 33:339–55.
103. Haile CN, Mahoney JJ, 3rd, Newton TF, De La Garza R, 2nd (2012) Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. *Pharmacol Ther* 134:260-277.
104. Hall FS, Sora I, Drgonova J, Li XF, Goeb M, Uhl GR (2004) Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 1025:47-56.
105. Hall K, Hilding A, Thoren M (1999) Determinants of circulating insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol Invest*. 22: 48–57.
106. Halpern JH, Sholar MB, Glowacki J, Mello NK, Mendelson JH, Siegel AJ (2003) Diminished interleukin-6 response to proinflammatory challenge in men and women after intravenous cocaine administration. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1188–1193.
107. Han C, Bae H, Kim DJ, Bae JY, Oh SI (2014) Or12–2 the relationship between insulin-like growth factor-1 and cognitive function in alcohol-dependent patient. *Alcohol . Alcohol*. 49 Suppl 1: i49.
108. Hashiguchi Y, Molina PE, Fan J, Lang CH, Abumrad NN (1996) Central opiate modulation of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Brain Res Bull*. 40: 99–104.
109. Hasin DS, Trautman KD, Miele GM, Samet S, Smith M, Endicott J (1996) Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry* 153:1195–1201.
110. Hasin D, Trautman K, Miele G, Endicott J. (2001). Psychiatric Research Interview for New York: New York State Psychiatric.
111. Hasin D, Liu X, Nunes E, McCloud S, Samet S, Endicott J (2002) Effects of major depression on remission and relapse of substance dependence. *Arch Gen Psychiatry*. 59:375-80.
112. Hasin D, Samet S, Nunes E, Meydan J, Matseoane K, Waxman R (2006) Diagnosis of comorbid psychiatric disorders in substance users assessed with the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders for DSM-IV. *Am J Psychiatry* 163:689–696.
113. Hasin DS, O'Brien CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, Budney A, Compton WM, Crowley T, Ling W, Petry NM, Schuckit M, Grant BF (2013) DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *Am J Psychiatry* 170:834–851.

114. Heinisch S, Kirby LG (2009) Fractalkine/CX3CL1 enhances GABA synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 164:1210–1223.
115. Heinisch S, Kirby LG (2010) SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 enhances GABA and glutamate synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 58:501–514.
116. Herrero MJ, Domingo-Salvany A, Torrens M, Brugal MT, ITINERE Investigators. (2007). Psychiatric comorbidity in young cocaine users: induced versus independent disorders. *Addiction* 103(2), 284–293.
117. Herrero MJ, Domingo Salvany A, Torrens M, Brugal MT; ITINERE Investigators (2008) Psychiatric comorbidity Depresión in young cocaine users: induced versus independent disorders. *Addiction*. 103:284-93.
118. Herrero MJ, Domingo-Salvany A, Torrens M, Brugal MT, Gutierrez F, Itinere I (2008) Personality profile in young current regular users of cocaine. *Subst Use Misuse* 43:1378-1394.
119. Irwin MR, Olmos L, Wang M, Valladares EM, Motivala SJ, Fong T, Newton T, Butch A, Olmstead R, Cole SW (2007) Cocaine dependence and acute cocaine induce decreases of monocyte proinflammatory cytokine expression across the diurnal period: autonomic mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 320:507–515.
120. Jacobsen LK, Southwick SM, Kosten TR (2001) Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry*. 158:1184-90.
121. Janca A, Ustün TB, Sartorius N (1994) New versions of World Health Organization instruments for the assessment of mental disorders. *Acta Psychiatr Scand*. 90(2):73-83.
122. Jankowski MM, Ignatowska-Jankowska B, Glac W, Swiergiel AH (2010) Cocaine administration increases CD4/CD8 lymphocyte ratio in peripheral blood despite lymphopenia and elevated corticosterone. *Int Immunopharmacol* 10:1229–1234.
123. Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, Constantinescu CS (2009) Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 287:212–215. Karila L, Petit A, Lowenstein W, Reynaud M (2012) Diagnosis and consequences of cocaine addiction. *Curr Med Chem* 19:5612–5618.
124. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, Fleshner M (2005) Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*. 135(4):1295-307.
125. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ (2013) The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol*. 9: 366–376.
126. Kalivas PW (2005) How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci*. 8(11):1440-1.
127. Kelly PH, Iversen SD (1976) Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *Eur J Pharmacol* 40:45-56.
128. Kenna HA, Reynolds-May M, Stepanenko A, Ketter TA, Hallmayer J, Rasgon NL (2014) Blood levels of brain derived neurotrophic factor in women with bipolar disorder and healthy control women. *J Affect Disord*. 156: 214–218.

129. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, et al (1994) Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*. 51: 8-19.
130. Kessler RC (2007) The epidemiology of dual diagnosis. *Biol Psychiatry*. 56 (10):730-7.
131. Koo JW, Duman RS (2008) IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(2):751-6.
132. Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35: 217–38.
133. Koppel J, Bradshaw H, Goldberg TE, Khalili H, Marambaud P, Walker MJ, Pazos M, Gordon ML, Christen E, Davies P (2009) Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. *Lipids Health Dis* 8:2.
134. Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O (2008) Neuroinflammation mediated by IL-1 $\beta$  increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 5:8.
135. Kovacs EJ, Messingham KA (2002) Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health*. 26:257–63.
136. Kubera M, Filip M, Budziszewska B, Basta-Kaim A, Wydra K, Leskiewicz M, Regulska M, Jaworska-Feil L, Przegalinski E, Machowska A, Lason W (2008) Immunosuppression induced by a conditioned stimulus associated with cocaine self-administration. *J Pharmacol Sci* 107:361–369.
137. Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14:299-302.
138. Lahey BB, Applegate B, McBurnett K, Biederman J, Greenhill L, Hynd GW, et al (1994) DSM-IV field trials for attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. *Am J Psychiatry* 151: 1673-85.
139. Lambert DM, Muccioli GG (2007) Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:735–44.
140. Landheim AS, Bakken K, Vaglum P (2006). Impact of comorbid psychiatric disorders on the outcome of substance abusers: a six year prospective follow-up in two Norwegian counties. *BMC Psychiatry*. 6:44.
141. Laudet AB, Mogura S, Vogel HS, Knight E (2000) Recovery challenges among dually diagnosed individuals. *J Subst Abuse Treat*. 18:321-9.
142. Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R, Glass K (2011) Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 31: 328-41.
143. Le Moal M, Koob GF (2007) Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*. 17(6-7):377-93.
144. Leshner AI, Koob GF (1999) Drugs of abuse and the brain. *Proc Assoc Am Physicians*. 111:99-108.



145. Leggio L, Ferrulli A, Malandrino N, Miceli A, Capristo E, Gasbarrini G, et al (2008) Insulin but not insulin growth factor-1 correlates with craving in currently drinking alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res.* 32: 450–458.
146. Levin FR, Evans SM, Kleber HD (1998) Prevalence of adult attention-deficit hyperactivity disorder among cocaine abusers seeking treatment. *Drug Alcohol Depend* 52: 15-25.
147. Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC (2011) Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8:67–80.
148. Lima-Reisser AA, Silva de Lima M, Soares BG, Farrell M. (2009). WITDRAWN: Carbamazepine for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* (1):CD002023.
149. Lin F, Suhr J, Diebold S, Heffner KL (2014) Associations between depressive symptoms and memory deficits vary as a function of insulin-like growth factor (IGF-1) levels in healthy older adults. *Psychoneuroendocrinology.* 42: 118–123.
150. Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodríguez A (2003) Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry* 160: 1028-40.
151. Liu X, Zhang T, He S, Hong B, Chen Z, Peng D, et al (2014) Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 218: 54–60.
152. LoVerme J1, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 77(14):1685-98.
153. Luccini E, Romei C, Di Prisco S, Raiteri M, Raiteri L (2010) Ionic dysregulations typical of ischemia provoke release of glycine and GABA by multiple mechanisms. *J Neurochem.* 114(4):1074-84.
154. Márquez L, Abanades S, Andreu M (2008) Endocannabinoid system and bowel inflammation. *Med Clin (Barc).* 131(13):513-7.
155. Torres-Aleman I (2010) Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol.* 70: 384–396.
156. Trueba-Saiz A, Cavada C, Fernandez AM, Leon T, Gonzalez DA, Fortea Ormaechea J, et al (2013) Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl Psychiatry.* 3: e330.
157. Maisonneuve IM, Ho A, Kreek MJ (1995) Chronic administration of a cocaine "binge" alters basal extracellular levels in male rats: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 272:652-657.
158. Malberg JE, Platt B, Rizzo SJ, Ring RH, Lucki I, Schechter LE, et al (2007) Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology.* 32: 2360–2368.
159. Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29(4):225-32.
160. Mandyam CD, Koob GF (2012) The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci* 35:250–260.



161. Marasco CC, Goodwin CR, Winder DG, Schramm-Sapota NL, McLean JA, Wikswo JP (2014) Systems-level view of cocaine addiction: the interconnection of the immune and nervous systems. *Exp Biol Med* (Maywood). 239(11):1433-42.
162. Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF (1993) Animal models of drug craving. *Psychopharmacology* (Berl) 112:163-182.
163. Martinowich K, Manji H, Lu B (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*. 10: 1089–1093.
164. Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, Scherma M, Fratta W, Fadda P, Barnes C, Redhi GH, Yasar S, Le Foll B, Tanda G, Piomelli D, Goldberg SR (2011) Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry* 69:633–641.
165. Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A (1996) N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol*. 300(3):227-36.
166. Merikangas KR, Mehta RL, Molnar BE, Walters EE, Swendsen JD, Aguilar-Gaziola S, et al (1998) Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict Behav*. 23:893-907.
167. Meyers L (2005) Depression increases type 2 risk. *Diabetes Forecast*. 58(9):38.
168. McGough JJ, Smalley SL, McCracken JT, Yang M, Del'Homme M, Lynn DE, et al. (2005) Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. *Am J Psychiatry*. 162: 1621-7.
169. Miller AH (2009) Norman cousins lecture. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain Behav Immun* 23:149–158.
170. Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65:732–741.
171. Miller AH, Raison CL (2015) Are Anti-inflammatory Therapies Viable Treatments for Psychiatric Disorders?: Where the Rubber Meets the Road. *JAMA Psychiatry*. 72(6):527-8.
172. Minozzi S, Amato L, Davoli M, Farrell M, Lima-Reisser AA, Pani PP, Silva de Lima M, Soares B, Vecchi S. (2008). Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. Apr 16; (2):CD006754.
173. Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V (2005) Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30:1216–1221.
174. Montgomery SL, Bowers WJ (2012) Tumor necrosis factor- $\alpha$  and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:42–59.
175. Morgello S, Holzer CE 3rd, Ryan E, Young C, Naseer M, Castellon SA, Frol AB, Atkinson JH, Gelman BB, Grant I, Singer EJ (2006) Interrater reliability of the psychiatric research interview for substance and mental disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS Tissue Consortium. *Int J Methods Psychiatr Res* 15:131–138.
176. Motivala SJ, Sarfatti A, Olmos L, Irwin MR (2005) Inflammatory markers and sleep disturbance in major depression. *Psychosom Med*. 67(2):187-94.

177. Mozaffarian D, Cao H, King I B, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, et al (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *AmJ Clin Nutr* 92:1350–8.
178. Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Aleman I (2012) Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci*. 49: 9–12.
179. Najavits LM1, Runkel R, Neuner C, Frank AF, Thase ME, Crits-Christoph P, Blaine J (2003) Rates and symptoms of PTSD among cocaine-dependent patients. *J Stud Alcohol*. 64(5):601-6.
180. National Institute of Drug Abuse (NIDA), EE.UU (2015). <http://www.drugabuse.gov>.
181. North CS, Pollio DE, Smith EM, Spitznagel EL (1998) Correlates of early onset and chronicity of homelessness in large urban homeless population. *J Ner Ment Dis*. 186:393-400.
182. Nunes EV, Hasin DS (1998). Overview of diagnostic methods: diagnostic criteria. Structured and semistructured interviews, and biological markers. En: . Kranzler HR, Rounsaville BJ, editores. *Dual diagnosis and treatment*. New York: Marcel Dekker, Inc;55-85.
183. OEDT. Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (2014). Encuesta 2013-2014 sobre consumo de sustancias psicoactivas en el ámbito laboral en España. Plan Nacional sobre drogas, Ministerio de Sanidad Servicios sociales e Igualdad. España.
184. OEDT. Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (2013.) Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Plan Nacional sobre drogas, Ministerio de Sanidad Servicios sociales e Igualdad. España.
185. O'Brien CP (2008) Review. Evidence-based treatments of addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3277-3286.
186. O'Brien CP (2012). Rationale for changes in DSM-5. *J Stud Alcohol Drugs*. 73(4):705.
187. O'Kusky J, Ye P (2012) Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol*. 33: 230–251.
188. Pani PP, Trogu E, Vecchi S, Amato L. (2011). Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database Syst Rev*. Dec 7; (12):CD002950.
189. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456–1458.
190. Pavarin R.M, (2006). Substance use and related problems: a study on the abuse of recreational and not recreational drugs in Northern Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 42,477–484.
191. Pavon FJ, Araos P, Pastor A, Calado M, Pedraz M, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Serrano A, Blanco E, Rivera P, Suarez J, Romero-Cuevas M, Pujadas M, Vergara-Moragues E, Gornemann I, Torrens M, de la Torre R, Rodriguez de Fonseca F (2013) Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* 18:955-969.
192. Patkar AA, Alexander RC, Lundy A, Certa KM (1999) Changing patterns of illicit substance abuse among schizophrenic patients: 1984-1996. *Am J Addic*. 8(1): 65-71.
193. Pérez de Los Cobos J, Siñol N, Puerta C, Cantillano V, López Zurita C, Trujols J (2011) Features and prevalence of patients with probable adult attention deficit hyperactivity disorder who request treatment for cocaine use disorders. *Psychiatry Res* 2011; 185: 205-10.

194. Piccinni A, Marazziti D, Catena M, Domenici L, Del Debbio A, Bianchi C, et al (2008) Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *J Affect Disord.* 105: 279–283.
195. Plan Nacional sobre Drogas, PNSD. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas 2015 Encuesta sobre alcohol y drogas en España EDADES 2013/2014.
196. Plan Nacional Sobre Drogas, PNSD. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas 2015. Encuesta sobre alcohol y drogas en España EDADES 2013/2014 Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas 2015.
197. Potvin S, Kouassi E, Lipp O, Bouchard RH, Roy MA, Demers MF, Gendron A, Astarita G, Piomelli D, Stip E (2008) Endogenous cannabinoids in patients with schizophrenia and substance use disorder during quetiapine therapy. *J Psychopharmacol* 22:262–269.
198. Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, Carballo S, Thomas A, Staub C, Steffens S, Seimbille Y, Golay A, Ratib O, Harsch E, Mach F, Schindler TH (2011) Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J* 32:1369–1378.
199. Quinones-Jenab V, Jenab S (2012) Influence of sex differences and gonadal hormones on cocaine addiction. *ILAR J* 53:14–22.
200. Reece AS (2013) Elevated IGF1 in clinical opiate dependence. *Neuro Endocrinol Lett* 34:18–26.
201. Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, Goodwin FK (1990) Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* 264:2511–2518.
202. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmächer T (2001) Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry.* 58(5):445–52.
203. Rivera P, Luque-Rojas MJ, Pastor A, Blanco E, Pavon FJ, Serrano A, et al (2013) Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *Eur J Neurosci.* 37: 105–117.
204. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223(1):22–38.
205. Robbins SJ, Ehrman RN, Childress AR, O'Brien CP (1999) Comparing levels of cocaine cue reactivity in male and female outpatients. *Drug Alcohol Depend* 53:223–230.
206. Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33–46.
207. Rodríguez-Arias M, Castillo A, Daza-Losada M, Aguilar MA, Minarro J (2009) Effects of extended cocaine conditioning in the reinstatement of place preference. *Physiol Behav* 96:620–630.
208. Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001) An anorectic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 414(6860):209–12.

209. Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 40(1):2-14.
210. (Rodríguez de Fonseca (2011). Los nuevos desafíos de la biología. Fundación General de la Universidad de Málaga. Servicio de publicaciones de Intercambio Científico de la Universidad de Málaga. UMA 2011.
211. Rofael HZ, Turkall RM, Abdel-Rahman MS (2003) Immunomodulation by cocaine and ketamine in postnatal rats. *Toxicology* 188:101–114.
212. Roncero C, Ros-Cucurull E, Daigre C, Casas M. (2012). Prevalence and risk factors of psychotic symptoms in cocaine-dependent patients. *Actas Esp Psiquiatr.* 40(4):187-97.
213. Roncero C, Rodriguez-Cintas L, Barral C, Fuste G, Daigre C, Ramos-Quiroga JA, Casas M (2012) Treatment adherence to treatment in substance users referred from Psychiatric Emergency service to outpatient treatment. *Actas Esp Psiquiatr* 40:63-69.
214. Roncero C, Ramos JA, Collazos F, Casas M., (2001). Complicaciones psicóticas del consumo de cocaína. *Adicciones*, 13(2): 179-189.
215. Roncero C, Castells X, Casas M (2007) Psicoestimulantes en esquizofrenia dual. En: Szerman N, Álvarez Vara C, Casas M. *Patología dual en esquizofrenia, opciones terapéuticas.* Glosa. p. 87-97.
216. Ros A, Valoria A, Nieto J (2004) Consumo de cocaína y otros psicoestimulantes: su relación con el síndrome de hiperactividad infantil. *Actas Esp Psiquiatría* 32: 346-52.
217. Rosa AR, Singh N, Whitaker E, de Brito M, Lewis AM, Vieta E, et al (2014) Altered plasma glutathione levels in bipolar disorder indicates higher oxidative stress; a possible risk factor for illness onset despite normal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Psychol Med.* 1–10.
218. Rossi S, Sacchetti L, Napolitano F, De Chiara V, Motta C, Studer V, Musella A, Barbieri F, Bari M, Bernardi G, Maccarrone M, Usiello A, Centonze D (2012) Interleukin-1beta causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *J Neurosci* 32:13896–13905.
219. Rothman RB, Baumann MH (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.* 479(1-3):23-40.
220. Salim S, Chugh G, Asghar M (2012) Inflammation in anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88:1–25.
221. Schubiner H (2005) Substance abuse in patients with attention- deficit hyperactivity disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs.* 19: 643-55.
222. Schuckit MA, Saunders JB (2006) The empirical basis of substance use disorders diagnosis: research recommendations for the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition (DSM-V). *Addiction* 101 Suppl 1:170-173.
223. Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science.* 1997; 275:1593-9.
224. Schuurs A H, Verheul H A (1990) Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* 35:157–72.

225. Schwarz E, Whitfield P, Nahnsen S, Wang L, Major H, Leweke FM, et al (2011). Alterations of primary fatty acid amides in serum of patients with severe mental illness. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:308–14.
226. Secnik K, Swensen A, Lage MJ (2005) Comorbidities and costs of adult patients diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacoeconomics*. 23: 93-102.
227. Serrano A, Parsons LH (2011) Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther* 132:215–41.
228. Sesack SR, Grace AA (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: micro circuitry. *Neuropsychopharmacology*. 35:27-47.
229. Syed SK, Bui HH, Beavers LS, Farb TB, Ficorilli J, Chesterfield AK, et al (2012) Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E1469–78.
230. Seib DR, Corsini NS, Ellwanger K, Plaas C, Mateos A, Pitzer C, Niehrs C, Celikel T, Martin-Villalba A (2013) Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell*. 12(2):204-14.
231. Sinha R (2011) New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr Psychiatry Rep*. 13: 398–405.
232. Smelson DA, Williams J, Ziedonis D, Sussner BD, Losonczy MF, Engelhart C, et al. (2004) A double blind placebo- controlled pilot study of risperidone for decreasing cue elicited craving in recently withdrawn cocaine dependent patients. *J Subst Abuse Treat*. 27:45-9.
233. Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*. 154(2):369-83.
234. Stouthart PJ, Deijen JB, Roffel M, Delemarre-van de Waal HA (2003) Quality of life of growth hormone (GH) deficient young adults during discontinuation and restart of GH therapy. *Psychoneuroendocrinology*. 28: 612–626.
235. Sun M1, Fink PJ (2007) A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J Immunol*. 179(7):4307-12.
236. Sobanski E, Brüggemann D, Alm B, Kern S, Philipsen A, Schmalzried H, et al. (2008) Subtype differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) with regard to ADHD-symptoms, psychiatric comorbidity and psychosocial adjustment. *Eur Psychiatry*. 23: 142-9.
237. Sordi AO, Pechansky F, Kessler FH, Kapczinski F, Pfaffenseller B, Gubert C, et al (2014) Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 231:4031–4039.
238. Spitzer RL, Forman JB, Nee J (1978) DSM-III field trials: I. Initial interrater diagnostic reliability. *Am J Psychiatry*. 136(6):815-7.
239. Stark R, Bauer E, Merz CJ, Zimmermann M, Reuter M, Plichta MM, et al. (2011) ADHD related behaviors are associated with brain activation in the reward system. *Neuropsychologia*. 49: 426-34.
240. Stuart MJ, Baune BT (2014) Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev* 42C:93–115.

241. Stuart MJ, Corrigan F, Baune BT (2014) Knockout of CXCR5 increases the population of immature neural cells and decreases proliferation in the hippocampal dentate gyrus. *J Neuroinflammation* 11:31.
242. Suliman S, Hemmings SM, Seedat S (2013) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci.* 7: 55.
243. Swartz M, Wagner H, Swanson J, Stroup T, McEvoy J, Canive J, et al (2006) Substance use in persons with schizophrenia: baseline prevalence and correlates from the NIMH CATIE study. *J Nerv Ment Dis.* 194: 164-72.
244. Syed SK, Bui HH, Beavers LS, Farb TB, Ficorilli J, Chesterfield AK, Kuo MS, Bokvist K, Barrett DG, Efanov AM (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(12):E1469-78
245. Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154:327-342.
246. Thomsen M, Hall FS, Uhl GR, Caine SB (2009) Dramatically decreased cocaine self-administration in dopamine but not serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci* 29:1087-1092.
247. Tiffany ST (1990) A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol Rev* 97:147-168.
248. Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R (2004) Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry* 161:1231–1237.
249. Torrens M. (2008). Patología dual: Situación actual y retos de futuro. *Adicciones.* Vol. 20(4): 315-320.
250. Torrens M, Martin-Santos R, Samet S. (2006). Importance of clinical diagnoses for comorbidity studies in substance use disorders. *Neurotox Res*, 10, 253-261.
251. Torrens M, Gilchrist G, Domingo-Salvany A, the psyCoBarcelona Group. (2011). Psychiatric comorbidity in illicit drug users: Substance-induced versus independent disorders. *Drug Alcohol Dependence*. 113: 147-156.
252. Torres-Aleman I (2010) Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol.* 70: 384–396.
253. Tracey KJ (2009) Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 9(6):418-28.
254. Trecki J, Unterwald EM (2009) Modulation of cocaine-induced activity by intracerebral administration of CXCL12. *Neuroscience* 161:13-22.
255. Trocello JM, Rostene W, Melik-Parsadaniantz S, Godefroy D, Roze E, Kitabgi P, Kuziel WA, Chalon S, Caboche J, Apartis E (2011) Implication of CCR2 chemokine receptor in cocaine-induced sensitization. *J Mol Neurosci* 44:147–151.
256. Trueba-Saiz A, Cavada C, Fernandez AM, Leon T, Gonzalez DA, Fortea Ormaechea J, et al (2013) Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl Psychiatry*. 3: e330.

257. Trulsson ME, Ullissey MJ (1987) Chronic cocaine administration decreases dopamine synthesis rate and increases [3H] spiroperidol binding in rat brain. *Brain Res Bull* 19:35-38.
258. Upadhyaya HP, Carpenter MJ (2008) Is attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptom severity associated with tobacco use? *Am J Addict.* 17: 195-8.
259. Van Harten PN, Van Trier JC, Horwitz EH, Martos GE, Hoek HW (1998) Cocaine as a risk factor for neuroleptic induced acute dystonia. *J Clin Psychiatry* 59(3):128-30.
260. Vergara-Moragues E, Gonzalez-Saiz F, Lozano OM, Betanzos Espinosa P, Fernandez Calderon F, Bilbao-Acebos I, Perez Garcia M, Verdejo Garcia A (2012) Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community: substance-induced versus independent disorders. *Psychiatry Res* 200:734-741.
261. Vergara- Moragues E. (2010). Comorbilidad Psicopatológica en Pacientes con Dependencia de Cocaína tratados en Comunidad Terapéutica. Tesis Doctoral. Facultad de Psicología. Universidad de Granada.
262. Vergara-Moragues E, González-Saiz F, Lozano OM, Betanzos P, Fernández F, Bilbao-Acebos I, Pérez M, Verdejo A. (2012). Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community: Substance-induced versus independent disorders. *Psychiatry Research*. 200. (2-3): 734-41.
263. Verheul R, Van den Brink W (2000) The role of personality pathology in the etiology and treatment of substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 13: 163-9.
264. Verheul R (2001) Comorbidity of personality disorders in individuals with substance use disorders. *Eur Psychiatry*. 16:274-82.
265. Viola TW, Tractenberg SG, Levandowski ML, Pezzi JC, Bauer ME, Teixeira AL, et al (2014) Neurotrophic factors in women with crack cocaine dependence during early abstinence: the role of early life stress. *J Psychiatry Neurosci*. 39: 206–214.
266. Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey SL, Logan J, Bendriem B, Christman D, et al. (1990) Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry* 147:719-724.
267. Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, Vitkun S, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Hitzemann R, Shea CE (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827-830.
268. Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, et al. (2009) Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *JAMA*. 302: 1084-91.
269. von Diemen L, Kapczinski F, Sordi AO, de Magalhaes Narvaez JC, Guimaraes LS, Kessler FH, et al (2014) Increase in brain-derived neurotrophic factor expression in early crack cocaine withdrawal. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17: 33–40.
270. Wang Y, Huang DS, Watson RR (1994) In vivo and in vitro cocaine modulation on production of cytokines in C57BL/6 mice. *Life Sci* 54:401–411.
271. Wegener N, Koch M (2008) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res*. 1253:81-91
272. Weiss F, Markou A, Lorang MT, Koob GF (1992) Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res* 593:314-318.



- 273. Wilens TE, Faraone SV, Biederman J, Gunawardene S (2003) Does stimulant therapy of attention-deficit/hyperactivity disorder beget later substance abuse? A meta-analytic review of the literature. *Pediatrics*. 111: 179-85.
- 274. Wilens TE, Upadhyaya HP (2007). Impact of substance use disorder on ADHD and its treatment. *J Clin Psychiatry*. 68: e20.
- 275. Winhusen T, Lewis D (2013) Sex differences in disinhibition and its relationship to physical abuse in a sample of stimulant-dependent patients. *Drug Alcohol Depend* 129:158-162.
- 276. Wiskerke J, Pattij T, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2008) The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addict Biol* 13:225–238.
- 277. Yamada K, Nabeshima T (2004) Pro- and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction: mini review. *Ann N Y Acad Sci* 1025:198–204.
- 278. Zorrilla EP1, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schmidt K (2001) The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun*. 15(3):199-226